



**Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo
Università di Roma "La Sapienza"**

**Dottorato di Ricerca in
Biologia Animale
XIX ciclo
(2003 - 2006)**

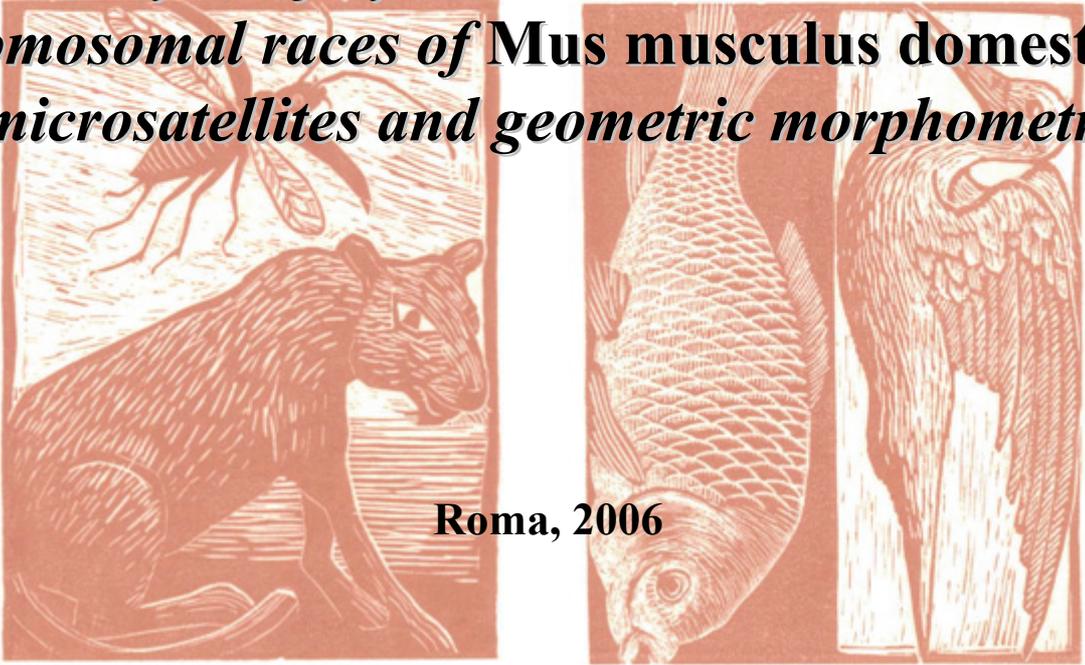
PAOLO FRANCHINI



**Tesi di Dottorato di Ricerca
Analisi di aree di ibridazione tra razze
cromosomiche di *Mus musculus domesticus*:
microsatelliti e morfometria geometrica**

PhD Dissertation

***Analysis of hybridization areas between
chromosomal races of *Mus musculus domesticus*:
microsatellites and geometric morphometry***



Roma, 2006

**Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo
Università di Roma "La Sapienza"**

**Dottorato di Ricerca in
Biologia Animale
XIX ciclo
(2003 - 2006)**

PAOLO FRANCHINI

Tesi di Dottorato di Ricerca

**Analisi di aree di ibridazione tra razze
cromosomiche di *Mus musculus domesticus*:
microsatelliti e morfometria geometrica**

PhD Dissertation

*Analysis of hybridization areas between
chromosomal races of *Mus musculus domesticus*:
microsatellites and geometric morphometry*

Roma, 2006

INDICE

1. Introduzione	1
1.1. La speciazione cromosomica	1
1.2. Il polimorfismo cromosomico in <i>Mus musculus domesticus</i>	2
1.3. Le zone di ibridazione ed il flusso genico	6
1.4. Le razze robertsoniane in Italia centrale	9
1.5. Le aree di studio	10
1.6. Obiettivo della tesi	12
2. Materiali e Metodi	15
2.1. Campione in esame	15
2.2. Metodi di analisi citogenetica	16
2.3. Selezione dei loci microsatelliti	16
2.4. Estrazione ed amplificazione del DNA	18
2.5. Elettroforesi e genotipizzazione del DNA	18
2.6. Analisi statistica	20
2.6.1. Analisi della variabilità intrapopolazionale	21
2.6.2. Analisi del differenziamento tra le popolazioni/razze	23
2.6.3. Analisi del flusso genico differenziale	27
2.7. Tecniche di morfometria geometrica	27
2.7.1. Taglia	28
2.7.2. Configurazione	29
2.7.3. Analisi morfometriche	34
2.8. Correlazione fra variazione genetica e morfologica	36
3. Risultati	39
3.1. Indagine citogenetica	39
3.2. Analisi genetica: i loci microsatelliti	41
3.2.1. Area di ibridazione: CD-Standard	41
3.2.1.1. Caratterizzazione genetica delle popolazioni	42
3.2.1.2. Equilibrio di Hardy-Weinberg e <i>linkage disequilibrium</i>	50

3.2.1.3.	Differenziamento delle popolazioni	53
3.2.1.3.1.	<i>Ipotesi di struttura</i>	55
3.2.1.3.2.	<i>Albero di massima verosimiglianza</i>	57
3.2.1.4.	Analisi del flusso genico posizione-dipendente	58
3.2.1.4.1.	<i>Alberi di massima verosimiglianza</i>	61
3.2.1.4.2.	<i>Test di assegnazione</i>	62
3.2.2.	Area di contatto: CD-ACR	65
3.2.2.1.	Caratterizzazione genetica delle popolazioni	66
3.2.2.2.	Equilibrio di Hardy-Weinberg e <i>linkage disequilibrium</i>	69
3.2.2.3.	Differenziamento delle popolazioni	70
3.2.2.3.1.	<i>Albero di massima verosimiglianza</i>	73
3.2.2.3.2.	<i>Test di assegnazione</i>	74
3.2.2.3.3.	<i>Ipotesi di struttura</i>	75
3.3.	Morfometria geometrica	79
3.3.1.	Descrizione dei <i>landmark</i>	79
3.3.2.	Area di ibridazione: CD-Standard	81
3.3.2.1.	Conformazione: analisi dei <i>relative warp</i>	81
3.3.2.2.	Conformazione: analisi multivariata della varianza	82
3.3.2.3.	Conformazione: analisi delle variate canoniche	84
3.3.2.4.	Conformazione: analisi discriminante	86
3.3.2.5.	Taglia: analisi univariata della varianza	90
3.3.2.6.	Taglia: <i>test T</i> di Student	92
3.3.2.7.	Correlazione fra variazione morfologica ed ambientale	92
3.3.3.	Area di contatto: CD-ACR	95
3.3.3.1.	Conformazione: analisi dei <i>relative warp</i>	95
3.3.3.2.	Conformazione: analisi multivariata della varianza	96
3.3.3.3.	Conformazione: analisi delle variate canoniche	98
3.3.3.4.	Conformazione: analisi discriminante	100
3.3.3.5.	Taglia: analisi univariata della varianza	103
3.3.3.6.	Taglia: <i>test T</i> di Student	105
3.3.3.7.	Correlazione fra variazione morfologica ed ambientale	105

3.3.4. Analisi dell'intero campione	108
3.3.4.1. Conformazione: analisi dei <i>relative warp</i>	108
3.3.4.2. Conformazione: analisi multivariata della varianza	109
3.3.4.3. Conformazione: analisi delle variate canoniche	110
3.3.4.4. Conformazione: analisi discriminante	113
3.3.4.5. Taglia: analisi univariata della varianza	117
3.3.4.6. Taglia: <i>test T</i> di Student	119
3.3.4.7. Correlazione fra variazione morfologica ed ambientale	119
3.4. Correlazione fra variazione genetica e morfologica	122
4. Discussione	125
4.1. Area di ibridazione	126
4.1.1. Struttura cromosomica	126
4.1.2. Diversità genetica e differenziamento fra le popolazioni	127
4.2. Area di contatto	130
4.2.1. Struttura cromosomica	130
4.2.2. Diversità genetica e differenziamento fra le popolazioni	131
4.3. Analisi morfologica	133
5. Conclusioni	139
6. Bibliografia	143
Appendice A	157
Appendice B	162

RIASSUNTO

Il topo delle case *Mus musculus domesticus* rappresenta un modello emblematico nello studio della speciazione cromosomica. Infatti, l'alta frequenza con la quale si verifica la fusione robertsoniana e la rapida fissazione in omozigosi dei cromosomi metacentrici neoformati ha favorito la produzione di numerose razze a cariotipo riordinato con assetto diploide compreso fra $2n = 40$ (numero tipico del genere *Mus*) e $2n = 22$ (massimo numero di fusioni). Le razze cromosomiche possono entrare in contatto e la compatibilità genomica fra di esse determinerà la possibilità di ottenere ibridi. Dalla scoperta della prima razza cromosomica nel 1969 in Val Poschiavo (Alpi svizzero-italiane), gli studi sul topo delle case hanno dedicato una particolare attenzione alle aree di contatto.

In questo lavoro sono state analizzate due aree di contatto in Italia centrale. La prima interessa la razza robertsoniana CD, $2n = 22$, e le popolazioni limitrofe a cariotipo standard; la seconda coinvolge due razze robertsoniane, la stessa CD e la razza ACR, $2n = 24$. Mentre la prima area presenta una fascia di ibridazione con un'estensione di circa 20 chilometri, nella seconda area si verifica un contatto parapatrico senza ibridazione.

Le due zone sono state analizzate tramite due approcci, uno molecolare ed uno morfologico.

L'analisi molecolare è stata condotta attraverso l'uso dei microsatelliti, un marcatore nucleare con un alto tasso di mutazione, condizione necessaria per poter riscontrare variazioni significative nella composizione allelica fra le razze cromosomiche. Infatti, da una serie di recenti studi, è emerso che le razze robertsoniane si sono evolute in tempi recenti, in un periodo compreso fra 10.000 e 3.000 anni fa.

I microsatelliti sono stati utilizzati per quantificare il flusso genico fra le razze cromosomiche in esame e, obiettivo principale della tesi, verificare l'esistenza di un flusso genico dipendente dalla posizione sul cromosoma. Studi citogenetici hanno mostrato come nelle configurazioni trivalenti di individui ibridi vi sia soppressione della ricombinazione in zona pericentromerica. Questo fenomeno dovrebbe riflettersi in un flusso genico differenziale nelle diverse zone del cromosoma. Sono quindi stati selezionati loci microsatelliti in posizione telomerica e pericentromerica.

L'analisi morfologica è stata eseguita tramite la morfometria geometrica applicata alla regione mandibolare. Questa tecnica è stata utilizzata per stimare le variazioni di forma e di taglia all'interno del campione delle due aree di contatto e verificare se tali variazioni possano

essere messe in relazione ad influenze di tipo genetico, adattativo o stocastico. Di particolare interesse nell'ambito delle influenze genetiche è stata la verifica di una correlazione fra variazione morfologica ed assetto cariotipico, oppure l'esistenza di una relazione fra le variazioni osservate ed il flusso genico.

Per quanto riguarda l'analisi molecolare, i risultati ottenuti hanno mostrato un debole differenziamento genetico fra le razze cromosomiche nell'area di ibridazione CD-Standard. Inoltre, è stata dimostrata la presenza di un flusso genico differenziale, più alto per i loci telomerici, e di conseguenza per le zone cromosomiche ad essi adiacenti, rispetto alle zone pericentromeriche. La soppressione della ricombinazione in zona pericentromerica nei trivalenti coopera, quindi, con la bassa fertilità degli ibridi nella riduzione del flusso genico lungo l'area di ibridazione.

Dall'analisi dei loci microsatelliti nell'area di contatto CD-ACR, invece, è emerso che, nonostante il contatto parapatrico, le due razze robertsoniane sono nettamente separate dal punto di vista genetico.

L'analisi morfometrica eseguita sul campione dell'area di ibridazione non ha evidenziato variazioni morfologiche correlate ad influenze genetiche o cariotipiche. Le rilevanti influenze di tipo stocastico potrebbero aver mascherato la variazione morfologica prodotta dal debole differenziamento genetico esistente fra le due razze cromosomiche.

L'area di contatto ha mostrato una situazione differente. Infatti, la netta separazione genetica fra le due razze robertsoniane ha prodotto una rilevante differenza nella morfologia della mandibola delle due stesse razze. E' stata evidenziata, inoltre, una componente di tipo stocastico sulla variazione morfologica, ma non sufficiente a mascherare la considerevole componente genetica.

Le aree analizzate tramite i due approcci hanno mostrato due differenti casi del processo di speciazione cromosomica. La zona di ibridazione rappresenta un esempio di isolamento riproduttivo in fase precoce. Infatti, gli eterozigoti strutturali presentano una bassa fertilità, ma non sufficiente a prevenire la formazione di gameti euploidi, ed il flusso genico, nonostante la dipendenza dalla posizione sul cromosoma, continua a verificarsi.

L'area di contatto CD-ACR costituisce un esempio di speciazione cromosomica ad uno stadio terminale, dove meccanismi di isolamento precopula hanno probabilmente rinforzato e accelerato la riduzione di scambio di materiale genetico fra le due razze cromosomiche.

ABSTRACT

The repeated occurrence and rapid fixation of Robertsonian (Rb) fusions have led to the formation of several chromosomal races in the house mouse, *Mus musculus domesticus*. The fusion between different telocentric chromosomes, and more rarely whole-arm reciprocal translocations (WARTs), have produced 97 populations with distinct combinations of metacentrics with a diploid number which is reduced to $2n = 22$ from the standard $2n = 40$, typical of the species.

Since the discovery of the first chromosomal race in the Swiss-Italian Alps, there have been several studies regarding the house mouse, with particular attention being paid to the contact zones between Rb races and between Rb races and surrounding standard populations. Two of these areas of contact occur in Central Italy and are well documented. The first is characterized by a parapatric contact between the $2n = 22$ CD race and a standard $2n = 40$ population; the second between the two chromosomal races $2n = 22$ CD and $2n = 24$ ACR.

Cytogenetics and mitochondrial markers have revealed that between the CD race and standard mice there is a 20 kilometre wide hybrid area, whereas the contact between CD and ACR races is more restricted and it does not reveal any sort of hybridization.

These two case studies represent key issues in the framework of chromosomal speciation in *Mus musculus domesticus*. In this work, the two contact areas were analysed using two different approaches, a molecular and a morphological one. The aim is to establish the occurrence or restriction of gene flow and the impact of these contact zones on the morphological differentiation between the races.

Molecular analysis was performed through the use of microsatellites. These nuclear markers, thanks to their fast mutation rate, represent an excellent tool to estimate gene flow between chromosomal races. In fact, recent studies have shown that Robertsonian races were only produced within the house mouse subspecies in the last 10.000-3.000 years.

We based our research on the results of several cytogenetic studies on structural heterozygote hybrids which have shown a fertility reduction down to complete sterility. Furthermore, observation of chiasma repatterning during meiosis has shown that trivalent configurations of hybrid specimens are subjected to recombination suppression at pericentromeric areas. Therefore it will be possible to verify whether this occurrence could produce a different gene flow depending on position along the chromosome.

Twelve microsatellite loci for the hybrid area between $2n = 22$ CD and $2n = 40$ standard mice (147 specimens), and eight loci for the $2n = 22$ CD and $2n = 24$ ACR contact (88 specimens) were used. These are situated either in a telomeric and pericentromeric position of the different chromosomal arms. In this way, we attempted to assess if differential gene flow could occur depending on locus position and therefore on pericentromeric recombination suppression. Furthermore, telomeric and pericentromeric loci of chromosome 19 were included, as this is the only telomeric shared by the races.

In the CD-Standard hybrid zone, the hierarchical population analysis (AMOVA) revealed that most of the total genetic variance is explained by the “within populations” level; while the “regions” ($2n = 22$, $2n = 40$) level showed significant differences depending on the position of the locus on the chromosomal arm. F_{ST} values and other kinds of analysis, such as the assignment test, showed the same pattern. Furthermore, a detailed analysis of allele frequencies of the pericentromeric loci demonstrated a clinal trend across the hybrid area in some cases. This pattern was not found for any telomeric locus. Finally, the chromosome 19 alleles do not follow any cline and F_{ST} values are comparable.

Low hybrid fertility is not, therefore, the only cause of the reduction of gene flow throughout this hybrid zone. Distribution of allele frequencies and population structuring indicate marked differences in gene flow between loci mapped on different positions along the chromosome arms which is lower in the pericentromeric area. The only centromeric locus with a relatively high gene flow is mapped on chromosome 19. Microsatellite analysis indicates the important role played by recombination suppression when it occurs near the pericentromeric zone of the trivalents in structural heterozygote hybrids.

In the CD-ACR contact zone, the analysis of microsatellite frequencies through the estimation of several genetic indexes (e.g. F_{ST} , R_{ST}), and other detailed analyses aimed to infer a genetic structure in a dataset, have revealed that the genetic separation between the two chromosomal races is higher than in the CD- $2n = 40$ zone. This is due to the fact that here the two races present a high number of metacentrics showing monobrachial homology which leads to the formation of one long multivalent ring of 14 metacentrics and a shorter chain of five chromosomes in the F1 hybrids. This meiotic configuration prevents correct gametogenesis causing a reduction of genetic exchange between races.

Morphological analysis was performed through the use of geometric morphometry. This technique was used to analyse the shape and size variations within the sample of the two contact areas. The aim of the study is to verify the presence of significant differences between the mice and, above all, to establish which kind of influences provoke them. In fact, the

morphological variations could be produced by genetic, adaptative or stochastic influences. Furthermore, of the genetic influences, we attempted to identify a correlation between gene flow and morphological variation and whether the latter could be related to the karyotypic forms.

Morphometric studies were performed on the labial side of the left mandible. Fifteen landmarks were collected from the digitalized images and statistical analyses were carried out in three different datasets: the first one composed by all landmarks, the second by the seven landmarks of the muscular region and the third by the eight landmarks of the dental region. These different analyses were performed because some past morphogenetic studies have demonstrated dissimilar levels of genetic or adaptative influences on morphological variations of these two anatomic regions. The hybridization sample and contact area sample are respectively composed by 117 and 81 specimens.

In the CD-2n = 40 hybrid zone there was no evidence of any morphological variation which was genetically or karyotypically related. The low genetic differentiation between the two races seemed to produce no differences in the mandible morphology. Furthermore, the observed relevant stochastic influences may have hidden them.

The CD-ACR contact area showed a different situation. Indeed, the pronounced genetic separation has produced an evident morphological differentiation between the two races. The stochastic influences, as in the hybridization area, were recorded in the contact area, but in this case these did not hide the morphological variations which are related to gene flow.

These case studies show two main different aspects that take place during the chromosomal speciation process. The CD-2n = 40 hybrid zone represents an example of reproductive isolation which has yet to be completed. Indeed, structural heterozygotes show a low fertility, but this is not sufficient to prevent the formation of euploid gametes, and gene flow still occurs, although it is dependent on locus position.

The CD-ACR contact area constitutes an example of a final stage of the speciation process, where the postzygotic barrier, due to hybrid sterility, has reduced the genetic exchange between the two chromosomal races.

1 - INTRODUZIONE

1.1 - La speciazione cromosomica

La maggior parte delle specie di piante ed animali presentano differenze nel loro cariotipo (White, 1978). Questa osservazione, abbinata all'evidenza che i riordinamenti dei cromosomi possono ridurre la fertilità degli ibridi in condizione di eterozigosi strutturale, ha condotto molti ricercatori ad ipotizzare un ruolo predominante dei cambiamenti cromosomici nella speciazione (White, 1978; King, 1993). White, partendo da questa idea, ha attribuito ai riordinamenti cromosomici un ruolo primario nella maggior parte degli eventi di speciazione.

Al modello proposto da White si è opposta una nutrita schiera di studiosi sostenendo che l'accumulo di differenze a livello cromosomico fra popolazioni sia un evento di secondaria importanza nel fenomeno della speciazione e che i meccanismi di isolamento riproduttivo abbiano una base essenzialmente genetica (Futuyma e Mayer, 1980; Coyne e Orr, 1998). Gli oppositori della speciazione cromosomica criticano questo modello per una serie di ragioni, tra le quali il fatto che molti eventi in cui sono coinvolti riordinamenti cromosomici, hanno un effetto minimo sulla fertilità degli ibridi (Sites e Moritz, 1987; Coyne *et al.*, 1993). Altre difficoltà sono associate alla fissazione in popolazione delle nuove varianti cromosomiche (Lande, 1985) ed alla convinzione che meccanismi di isolamento precopula si verifichino prima dei riordinamenti cromosomici e quindi abbiano un ruolo predominante nella speciazione (Schluter, 1998).

Nonostante la forte opposizione, il notevole supporto ricevuto dalla teoria della speciazione cromosomica ha favorito la teorizzazione di una serie di modelli in grado di spiegarne i meccanismi (King, 1993). I modelli proposti condividono un assunto fondamentale: le differenze cromosomiche che si sono accumulate tra le specie in via di formazione ed i relativi progenitori riducono la fertilità o la vitalità degli ibridi, riducendo, quindi, il flusso genico fra di esse (Turelli *et al.*, 2001). Le variazioni principali fra i modelli proposti interessano, ad esempio, la presenza o meno di barriere geografiche, il meccanismo attraverso il quale i riordinamenti vengono prodotti e si fissano nelle popolazioni, l'effetto dei cambiamenti cromosomici sulla *fitness* degli ibridi in condizioni di eterozigosi strutturale.

Uno degli organismi modello nello studio della speciazione cromosomica è il topo delle case, *Mus musculus domesticus* (Sage *et al.*, 1993). La grande variabilità cromosomica espressa dal topo fu considerato da White (1978) un chiaro esempio della sua ipotesi di “evoluzione stasipatrica”, un modello che non prevede isolamento geografico, che egli propose (White, 1968) per spiegare l’evoluzione cromosomica di alcuni Ortoteri australiani. In questi organismi, grazie alla loro limitata vagilità, una serie di riordinamenti cromosomici si erano fissati in omozigosi in diverse popolazioni e avevano reso possibile l’instaurarsi di un certo grado di isolamento genetico ponendo le premesse per un processo di speciazione.

Studi successivi portarono alla formulazione di nuovi modelli di speciazione nel topo delle case, nei quali un ruolo importante si supposeva fosse svolto da una componente di tipo allopatrico. Fra questi, il modello allopatrico di Mayr (1970) e quello alloperipatrico teorizzato da Capanna e Redi (1994) sono quelli che hanno riscosso maggior successo nella comunità scientifica. Dover *et al.* (1984), d’altro canto, criticando il concetto di speciazione stasipatrica di White, che prevedeva la presenza di una certa funzione adattativa della variante cromosomica nel nuovo ambiente colonizzato, ipotizzarono che l’accumulo di cromosomi metacentrici era da considerarsi un meccanismo puramente stocastico di *molecular drive*.

1.2 - Il polimorfismo cromosomico in *Mus musculus domesticus*

Il topo delle case, *Mus musculus domesticus*, presenta un cariotipo standard di 40 cromosomi telocentrici, tipico di tutte le specie appartenenti al genere *Mus*. Dalla descrizione da parte di Alfred Gropp e collaboratori (Gropp *et al.*, 1969) del primo topo con cariotipo ridotto, si aprì una fase di intensi studi citogenetici mirati al chiarimento dei complessi meccanismi molecolari interessati nel riordinamento cromosomico. Gli esemplari scoperti da Gropp nel 1969 furono in un primo tempo attribuiti ad una diversa specie, *Mus poschiavinus* (nome derivato dal luogo di provenienza, la Val Poschiavo, Svizzera), in base alla consistente diversità cariotipica (figura 1.1). Questi individui, infatti, presentavano un numero diploide pari a 26 cromosomi, dei quali sette paia metacentrici. Solo successivamente fu scoperto che i topi di Gropp appartenevano in realtà alla sottospecie *Mus musculus domesticus* e che la loro peculiarità cariotipica era determinata da fusioni robertsoniane (Robertson, 1916). La fusione a livello del centromero di telocentrici in diverse combinazioni e la successiva fissazione in omozigosi ha prodotto numerose razze cromosomiche con numero diploide variabile da $2n =$

38 a $2n = 22$ (Capanna, 1982). Inoltre, il metacentrico mantiene un'elevata plasticità cromosomica, poiché è in grado di scambiare braccia cromosomiche con altri metacentrici (Capanna e Redi, 1995; Castiglia e Capanna, 1999b) o con altri telocentrici (Catalan e Britton-Davidian, 1998). Tali meccanismi prendono il nome rispettivamente di WART (*whole-arm reciprocal translocation*) e di SAT (*non reciprocal single arm translocation*).

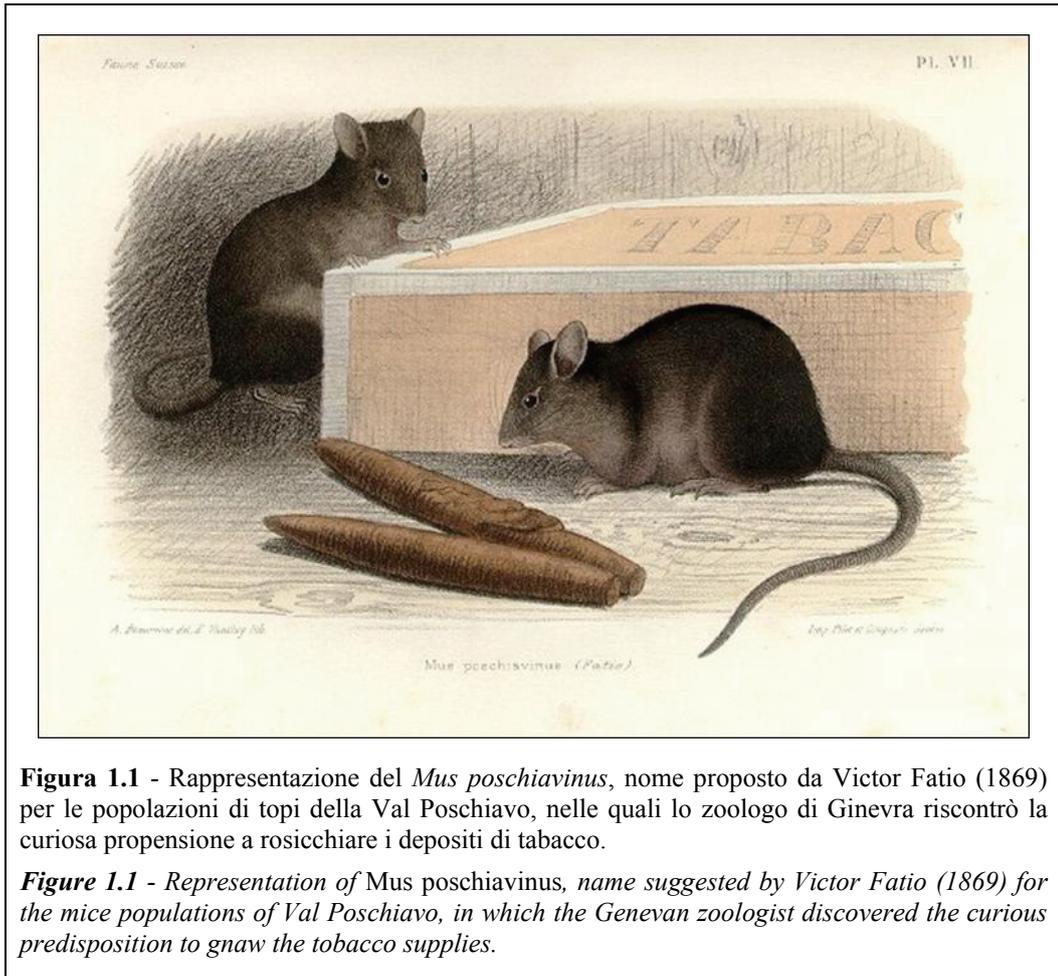


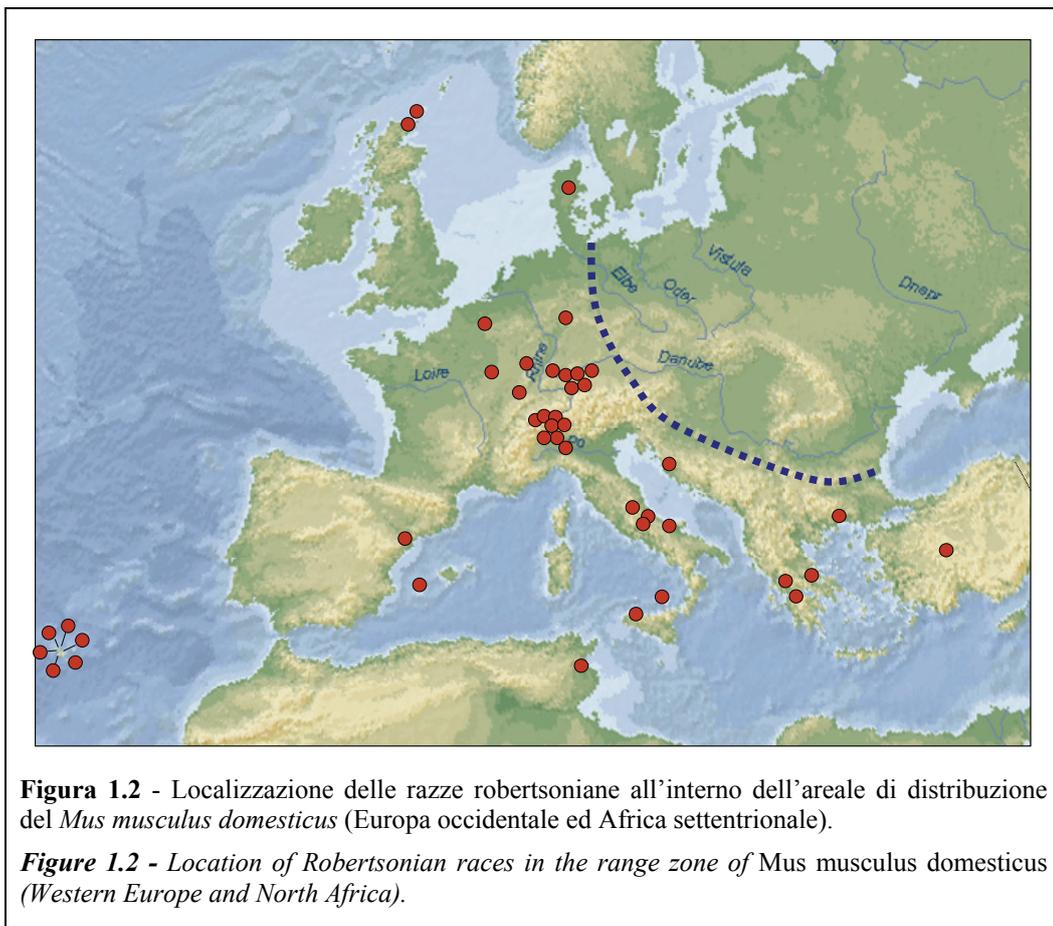
Figura 1.1 - Rappresentazione del *Mus poschiavinus*, nome proposto da Victor Fatio (1869) per le popolazioni di topi della Val Poschiavo, nelle quali lo zoologo di Ginevra riscontrò la curiosa propensione a rosicchiare i depositi di tabacco.

Figure 1.1 - Representation of *Mus poschiavinus*, name suggested by Victor Fatio (1869) for the mice populations of Val Poschiavo, in which the Genevan zoologist discovered the curious predisposition to gnaw the tobacco supplies.

Solamente i cromosomi sessuali non sono mai coinvolti in fusioni in popolazioni naturali e raramente il cromosoma 19, il più piccolo degli autosomi, partecipa alla fusione centrica, anche se alcuni autori affermano che la frequenza delle fusioni a carico del cromosoma 19 non è inferiore a quella degli altri autosomi (Gazave *et al.*, 2003). Fino a pochi anni fa si credeva che l'autosoma 19 non contribuisse alla variazione cromosomica del topo delle case (Nachman e Searle, 1995; Hauffe e Piálek, 1997). Due recenti lavori, invece, hanno

documentato la presenza dei metacentrici Rb(2.19) e Rb(11.19) nell'isola di Madeira (Britton-Davidian *et al.*, 2000) e del Rb(4.19) in ibridi di laboratorio ottenuti in Belgio (Auffray *et al.*, 2001). Considerando che tutti i 19 cromosomi autosomici possono partecipare alla formazione di un metacentrico, le fusioni possibili sono 171; fino ad oggi solo 103 ne sono state documentate.

L'effetto combinato dei vari tipi di fusioni ha portato alla formazione di 97 distinte popolazioni metacentriche, ovvero popolazioni di topo nelle quali vi è la presenza di uno o più cromosomi metacentrici, non necessariamente fissati in omozigosi, situazione particolare nella quale le popolazioni si definiscono razze cromosomiche o robertsoniane (Piálek *et al.*, 2005). Queste sono distribuite in piccoli *patch*, di solito circondati da popolazioni con cariotipo standard. Con un tale modello di distribuzione la sottospecie *Mus musculus domesticus* copre in modo continuo il suo areale che comprende l'Europa occidentale e l'Africa del nord (figura 1.2).



La formazione delle razze cromosomiche in *Mus musculus domesticus* è un evento recente. Da una serie di studi molecolari e paleontologici è emerso che l'accumulo dei cromosomi metacentrici si è verificato negli ultimi 10.000 anni (Auffray *et al.*, 1990; Nachman *et al.*, 1994), o addirittura negli ultimi 3.000 anni, come ipotizzato da Cucchi *et al.* (2005). La notevole variabilità cromosomica e la rapida evoluzione hanno fatto del *Mus musculus domesticus* l'organismo modello nello studio della speciazione influenzata da riordinamenti strutturali del genoma. I metacentrici robertsoniani, infatti, sono stati scoperti con alta frequenza principalmente nel topo delle case. Comunque, in casi sporadici, fusioni centriche sono anche state documentate in altri membri del complesso *Mus musculus* (*M. m. castaneus*: Chakrabarti e Chakrabarti, 1977; *M. m. molossinus*: Moriwaki *et al.*, 1984; *M. m. musculus*: Zima e Macholán, 1989).

La consistente mole di studi sulla variabilità cromosomica del topo delle case si è incentrata sul meccanismo molecolare che sta alla base della fusione robertsoniana, sul modello di formazione delle razze, sulle analisi delle aree di ibridazione e sulla fertilità degli ibridi.

La formazione delle razze robertsoniane in *Mus musculus domesticus* è condizionata dalla mutazione che produce il cromosoma metacentrico e questa sembra avere uno stretto legame con l'organizzazione del DNA satellite nei centromeri, nella sottospecie in esame più omogeneo rispetto ad esempio al *M. m. musculus* (Redi *et al.*, 1990). Durante l'evento di fusione avviene una perdita di materiale telomerico a livello delle sequenze di DNA satellite minore (Garagna *et al.*, 1995). I due telocentrici coinvolti perdono circa 10-30 kb di satellite minore ciascuno, evento confermato da analisi di ibridazione *in situ* sulla cromatina di cromosomi telocentrici e metacentrici (Garagna *et al.*, 2001; Garagna *et al.*, 2002). La scissione del metacentrico neoformato è altamente improbabile, ostacolata dalla difficoltà nel recuperare il materiale telomerico perduto (Garagna *et al.*, 1995).

La mutazione che favorisce la fusione centrica è solo il primo passo nella formazione di una razza cromosomica. Il metacentrico neoformato deve necessariamente diffondersi fra gli individui della popolazione e fissarsi in omozigosi. Partendo da questo presupposto, una serie di studi ha cercato di chiarire gli agenti in grado di promuovere od ostacolare la diffusione del metacentrico in condizione eterozigote. Fra i fattori a favore, l'inincrocio svolge un ruolo fondamentale. Questo è favorito da popolazioni di dimensione ridotte ed isolate, condizioni spesso garantite dal comportamento commensale del topo. Per questo motivo, le razze cromosomiche sono spesso localizzate in aree insulari o montuose, dove la vita commensale è obbligata dalle condizioni ambientali ostili.

Un altro fattore che potrebbe favorire la trasmissione del metacentrico è il suo vantaggio selettivo sul cromosoma telocentrico. Un modello proposto da Capanna e Redi (1994) mostra come una fusione centrica sia in grado di riorganizzare spazialmente il nucleo interfascico ed alterare l'espressione genica.

Infine, il *meiotic drive* potrebbe svolgere un ruolo chiave nella fissazione del metacentrico neoformato, favorendone la segregazione e quindi la rapida diffusione all'interno della popolazione (Pardo-Manuel de Villena e Sapienza, 2001). La trasmissione preferenziale del metacentrico è, comunque, un argomento in fase di studio e di dibattito e per un quadro completo del meccanismo occorre comprendere tutte le variabili in gioco. Per esempio, in uno studio di Castiglia e Capanna (2000) sull'area di ibridazione fra la razza CD e popolazioni a cariotipo standard (una delle due zone studiate in questa tesi) è emerso che il tasso di trasmissione dei metacentrici è legato alla loro lunghezza, più alto per i cromosomi robertsoniani più piccoli.

Il principale fattore che limita la diffusione del metacentrico è da imputare, invece, alla bassa fertilità degli ibridi (Redi e Capanna, 1988; Hauffe e Searle, 1998; Castiglia e Capanna, 2002). Durante il pachitene, infatti, il non corretto appaiamento dei cromosomi omologhi può condurre alla malsegregazione durante l'anafase I e dare origine a gameti aneuploidi, causa di sterilità dell'individuo ibrido. E' stato dimostrato come all'aumentare del numero dei metacentrici in condizione di eterozigosi semplice, si verifica un decadimento della fertilità degli ibridi (Castiglia e Capanna, 2000; Hauffe e Searle, 1998).

1.3 - Le zone di ibridazione ed il flusso genico

Le zone ibridazione sono aree geografiche dove due popolazioni che si differenziano per uno o più caratteri ereditabili si incontrano e si accoppiano (Barton, 1985). Le due popolazioni che si incontrano (identificate come sottospecie o razze) possono differenziarsi per caratteristiche genetiche, morfologiche o comportamentali. La dimensione di una zona ibrida può variare da poche centinaia di metri fino a centinaia di chilometri a seconda della specie interessata, della natura delle differenze e della conformazione dell'habitat.

Una comune tipologia di aree di ibridazione è quella clinale. I clini possono essere rilevati tramite l'osservazione della frequenza di un certo allele diagnostico o di una caratteristica fenotipica lungo un transetto che unisce le due popolazioni parentali. Una

rappresentazione grafica della frequenza dei marcatori in esame ha spesso la forma di una curva sigmoide che può avere andamento graduale o variare in modo netto a seconda del rapporto fra la fitness degli ibridi e la dispersione all'interno dell'area (Barton, 1983). Una zona di ibridazione può formarsi quando due popolazioni vengono a contatto dopo un periodo di separazione geografica (zone di ibridazione secondarie). Fra le due popolazioni si verifica un flusso genico di entità inversamente proporzionale all'incompatibilità (genetica, morfologica o comportamentale) accumulata nel periodo di separazione allopatrica e, tramite gli ibridi, i geni "distintivi" di una popolazione parentale possono addentrarsi nell'altra (introgressione).

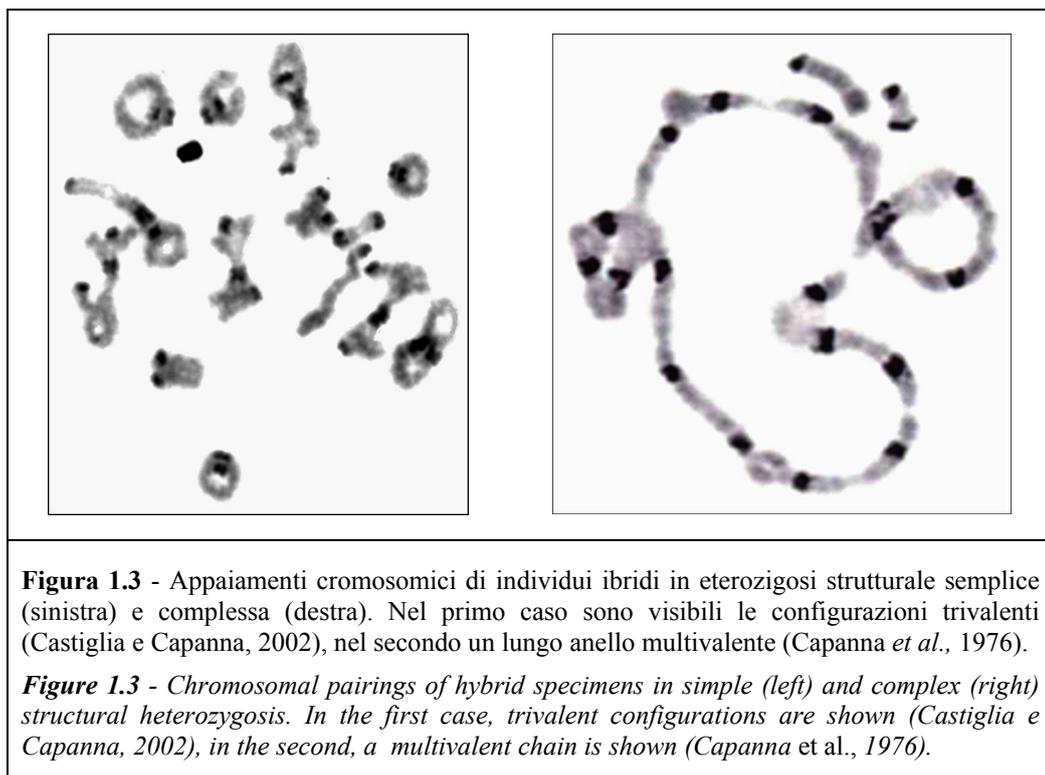
Un altro tipo di zona di ibridazione si verifica in condizioni di parapatria, quando le differenze fra le due popolazioni parentali si sono evolute in una distribuzione continua a causa di marcate variazioni ecologiche (zona di ibridazione primaria). La distinzione fra una zona di ibridazione primaria o secondaria non è attuabile tramite l'osservazione della struttura dell'area, ma solo dopo un esame storico e biogeografico dell'area stessa.

La dinamica di una zona di ibridazione neofornata andrà incontro a destini diversi a seconda della *fitness* degli ibridi. Se questa ha la stessa entità di quella delle razze parentali, l'area ibrida si allargherà e, dopo un determinato periodo, l'elevato flusso genico tenderà a ricombinare i due genotipi parentali (diffusione neutra). Se la *fitness* di una delle due popolazioni parentali è superiore a quella dell'altra popolazione e degli ibridi, il genotipo avvantaggiato sostituirà gli altri (onda di avanzamento).

Esistono altre situazioni in cui l'area di ibridazione si stabilizzerà. Ad esempio, se i genotipi degli ibridi sono favoriti in ambienti intermedi rispetto a quelli parentali, l'area sarà stabilizzata in ambienti ecotonali (clini ambientali-ecologici). In un altro caso (*hybrid superiority model*), se i genotipi parentali sono adattati ad ambienti diversi e gli ibridi hanno una *fitness* superiore in ambienti intermedi, allora la distribuzione di questi *habitat* determinerà la forma della zona ibrida (Moore, 1977). L'ultimo modello prevede che la zona di ibridazione venga stabilizzata dall'equilibrio di due forze contrapposte, migrazione e selezione contro i genotipi ibridi (Bazykin, 1969). In una situazione di questo tipo, la bassa *fitness* degli ibridi, dovuta nella maggior parte dei casi ad incompatibilità genomiche, porterebbe ad una riduzione della zona ibrida fino alla sua scomparsa, effetto contrastato dal continuo rifornimento di individui da parte delle popolazioni parentali e quindi formazione di nuovi ibridi (*tension-zone*). La bassa fertilità degli ibridi in una *tension-zone* si oppone al libero flusso genico fra le due popolazioni parentali contribuendo a mantenere fra di esse un certo grado di separazione genetica.

Le razze cromosomiche in *Mus musculus domesticus* spesso vengono a contatto e formano, nella quasi totalità dei casi, aree di ibridazione. Lo studio di queste aree è fondamentale per comprendere i meccanismi della speciazione cromosomica. Infatti, rendono possibile studiare l'effetto del differenziamento cromosomico in condizioni naturali attraverso la valutazione della *fitness* degli ibridi, rispetto a quella degli omozigoti, e l'entità del flusso genico.

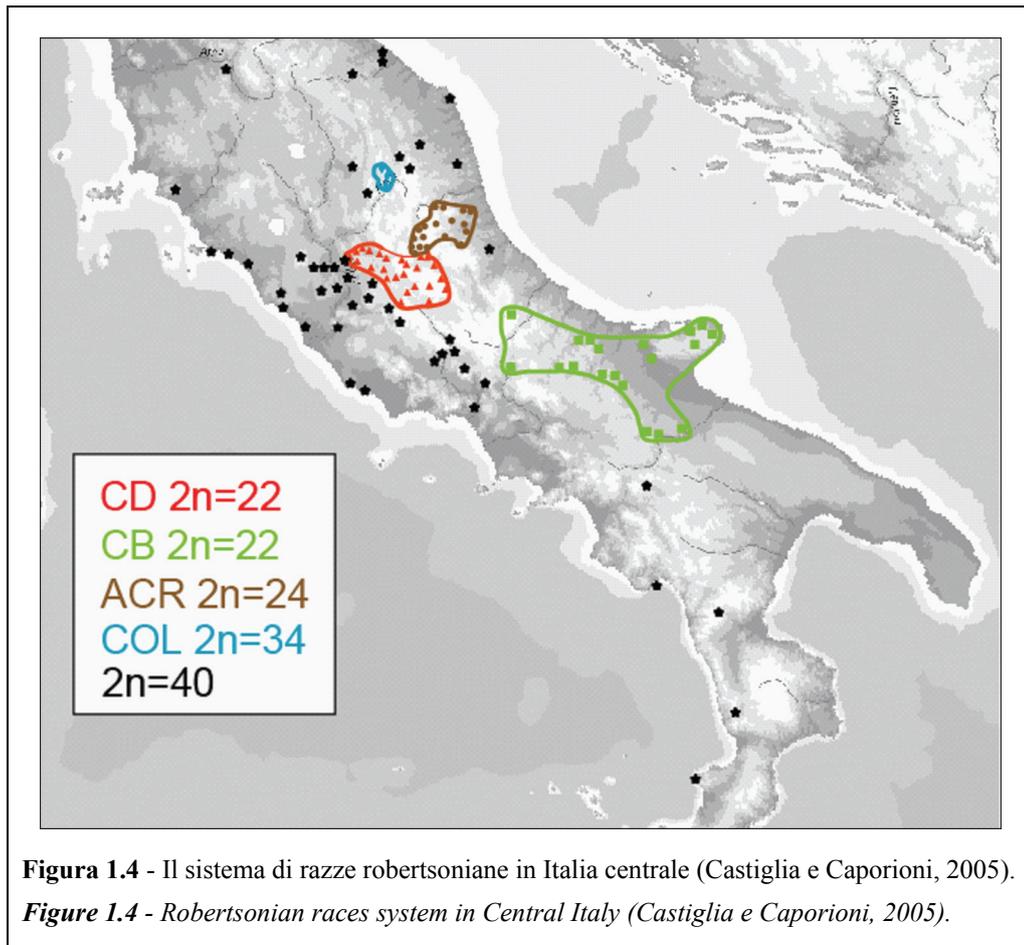
Le aree di ibridazione nel *M. m. domesticus* possono essere distinte in due categorie: aree di contatto fra popolazioni robertsoniane ed a cariotipo standard ed aree di contatto fra popolazione robertsoniane. Nel primo caso gli ibridi presentano configurazioni trivalenti dei cromosomi durante la meiosi (formate da un metacentrico e i corrispettivi telocentrici omologhi) che non compromettono la fertilità dell'individuo (eterozigosi strutturale semplice), anche se la riducono a causa della produzione di gameti aneuploidi (figura 1.3). La fertilità diminuisce all'aumentare del numero di trivalenti. Nel secondo caso gli ibridi prodotti dal contatto fra razze robertsoniane, recanti omologia monobrachiale, producono, durante la meiosi, delle configurazioni multivalenti di formate da un numero variabile di cromosomi che formano figure ad anello o a catena (eterozigoti strutturale complessa). In questo caso si ha una più elevata produzione di gameti aneuploidi, che riducono in modo drastico la fertilità degli ibridi, in alcuni casi completamente compromessa (figura 1.3).



Le zone di ibridazione fra razze cromosomiche nel *M. m. domesticus* hanno anche un'importanza notevole nella formazione di nuove combinazioni omozigoti di metacentrici. Questo processo, postulato per la prima volta da Capanna (1982) è stato descritto in molte aree di ibridazione in Europa occidentale ed è stato denominato *zonal raiation* (vedi ad esempio: Bauchau *et al.*, 1990; Bidau *et al.*, 2001; Piálek *et al.*, 2001; Capanna e Castiglia, 2004; Hauffe *et al.*, 2004). Le premesse per ottenere un nuovo omocariotipo sono la produzione di almeno qualche ibrido F1 fertile che presenti almeno due configurazioni eterozigoti durante la meiosi I. Attraverso la produzione di successive generazioni di ibridi uno dei due metacentrici può fissarsi in omozigosi e, avendo l'opportunità di colonizzare nuove aree, può espandere il suo habitat come ogni altra razza.

1.4 - Le razze robertsoniane in Italia centrale

In Italia centrale sono presenti 4 razze cromosomiche: la razza Cittaducale (CD: $2n = 22$), la razza Ancarano (ACR: $2n = 24$), la razza Campobasso (CB: $2n = 22$) e la razza Colfiorito (COL: $2n = 34$). La razza CD, il cui assetto diploide è stato identificato da Capanna *et al.*, (1975), è distribuita nell'alto Lazio, prevalentemente nella provincia di Rieti, con propaggini nell'Abruzzo occidentale, dove viene in contatto con la razza ACR. Quest'ultima, descritta da Gropp *et al.* (1977), ha il suo areale di distribuzione a nord-est rispetto alla CD, a cavallo fra Umbria, Abruzzo e Lazio. Non vi sono metacentrici in comune fra le due razze. La razza CB, le cui fusioni sono state identificate da Capanna *et al.* (1977), occupa una regione compresa fra il basso Molise e la regione settentrionale della Puglia. Le popolazioni a 22 cromosomi del sistema CB hanno in comune un metacentrico con la razza CD, Rb(9.16), e due con la razza ACR, Rb(8.14) e Rb(10.12). Infine, la razza COL, descritta da Sadoyan *et al.* (2003), occupa una ristretta area nell'Umbria orientale e ha il metacentrico Rb(10.12) in comune con le razze ACR e CB. Il sistema di razze robertsoniane in Italia centrale è mostrato in figura 1.4, mappa estratta dall'ultima revisione eseguita da Castiglia e Caporioni (2005).



1.5 - Le aree di studio

In questo lavoro sono state analizzate le aree di contatto fra la razza CD e popolazioni a cariotipo standard e fra la razza CD e la razza ACR. Per quanto riguarda la prima area, una delle prime ad essere state individuate e studiate (Spirito *et al.*, 1980; Capanna *et al.*, 1985; Castiglia e Capanna, 1999a; Corti e Ciabatti 1990; Castiglia *et al.*, 2002;), l'analisi è stata focalizzata lungo un transetto coincidente con una stretta valle montana (figura 3.4) nei pressi di Rieti. Fra le due popolazioni parentali, situate agli estremi del transetto, si estende una fascia di ibridazione con un'estensione di circa 20 chilometri, già studiato da Spirito *et al.* (1980) e successivamente da Castiglia e Capanna (1999a).

La seconda area di contatto presenta una ristretta zona di parapatria fra le due razze nei pressi di Pizzoli, un piccolo paese pochi chilometri ad ovest di L'Aquila (figura 3.9). La quasi totale assenza di ibridazione è dovuta alla profonda diversificazione cariotipica delle due razze, che non hanno in comune nessun metacentrico. Come conseguenza, durante la meiosi la prima

generazione di ibridi presenta un lungo anello multivalente composto da 14 metacentrici e una catena più corta di 5 cromosomi (Castiglia *et al.*, 2002). È stata dimostrata la completa sterilità dei maschi ibridi, di questo tipo, attraverso le osservazioni dei testicoli al microscopio elettronico (Malorni *et al.*, 1982).

Negli ultimi anni le due aree sono state sottoposte ad una serie di studi genetici, morfologici e comportamentali. Per quanto riguarda la zona di ibridazione CD-Standard, in questo e in un altro transetto nella zona di Viterbo, è stato dimostrato che gli esemplari appartenenti alle popolazioni ibride presentano un gradiente cromosomico con un numero di metacentrici che va diminuendo dalla zona occupata dalla razza CD a quella con popolazioni a 40 cromosomi telocentrici (Castiglia e Capanna, 1999a). Il livello di eterozigosità strutturale sembra ridurre la fertilità degli ibridi, anche se in modo meno consistente di quanto creduto da analisi di ibridi in laboratorio (Corti, Ciabatti e Capanna, 1990; Capanna e Castiglia, 2002).

È stato, inoltre, rilevato un gradiente morfologico fra la razza CD e le popolazioni standard, ma questo non sembra essere correlato con il numero cromosomico (Corti e Thorpe, 1989). Infine, studi sul comportamento hanno mostrato una maggiore aggressività degli esemplari appartenenti alla razza CD rispetto agli individui con cariotipo standard (Corti *et al.*, 1989).

Per quanto riguarda l'area di contatto CD-ACR, la separazione genetica fra le razze è deducibile dalla profonda differenza cariologica esistente fra di esse. A conferma di questo, nell'area sono stati trovati solamente due ibridi, uno dei quali portatore di WART, con *background* cariotipico ACR, ma con un metacentrico che deriva dalla razza CD, situazione che fa ipotizzare uno sporadico evento di ibridazione (Castiglia e Capanna, 1999b). L'altro ibrido, scoperto tramite un'indagine genetica usando come marcatore la regione di controllo del mtDNA, ha il cariotipo ACR ma un aplotipo caratteristico della razza CD (Castiglia *et al.*, 2002). L'assenza di barriere geografiche in questa area di contatto suggerisce la presenza di meccanismi di isolamento precopula o di accoppiamento assortativo, anche se non è facile stabilire se tali meccanismi si siano selezionati a causa della bassa fertilità degli ibridi o se fossero presenti anche prima del contatto fra le due razze (Capanna e Castiglia, 2004; Carpitetti e Castiglia, 2004).

Per la valutazione del flusso genico in queste aree di ibridazione è necessario utilizzare marcatori genetici con un rapido tasso di evoluzione.

I marcatori genetici usati in questi lavori non sono stati in grado, però, di valutare l'entità del flusso genico, se non in modo indiretto, a causa dei lenti tassi di mutazione. Infatti, le razze cromosomiche si sono evolute negli ultimi 3.000-10.000 anni, un tempo troppo breve

affinché nei marcatori mitocondriali o negli allozimi (Nachman *et al.*, 1994; Britton-Davidian *et al.*, 2002) vi sia stato un accumulo sufficiente di mutazioni in grado di rilevare il differenziamento genetico sviluppatosi nelle razze stesse. A tal fine, i microsatelliti rappresentano dei marcatori nucleari che non si limitano come i marcatori mitocondriali a dare informazioni sulle linee matrocline, sono evolutivamente neutri, hanno tassi di mutazione rapidi (circa 10^{-3} mutazioni per generazione, molto più elevati di altri marcatori nucleari, come gli allozimi) ed un elevato livello di polimorfismo (Dallas, 1992; Schlotterer, 2000). Per questi motivi sono i candidati ideali per rilevare il flusso genico fra razze recenti come le popolazioni metacentriche del *Mus musculus domesticus*, e per poter risolvere la struttura delle popolazioni.

1.6 - Obiettivo della tesi

In questa tesi, le due aree di contatto descritte nel paragrafo precedente sono state analizzate tramite due approcci, uno molecolare, utilizzando i microsatelliti, ed uno morfologico, applicando la morfometria geometrica alla regione mandibolare.

Per quanto riguarda la zona di ibridazione CD-Standard, i microsatelliti sono stati utilizzati per esaminare il flusso genico attraverso un transetto costituito da 10 popolazioni localizzate lungo l'area. Da una serie di studi incentrati sull'analisi delle meiosi e sulla fertilità degli ibridi, è emerso come la zona di ibridazione possa svolgere un ruolo determinante nel ridurre lo scambio di geni fra le razze parentali. L'analisi delle frequenze alleliche dei loci microsatelliti è in grado di fornire, per la prima volta tramite un marcatore molecolare, una stima diretta del flusso genico all'interno dell'area in esame e verificare quindi, oltre al grado di differenziamento delle popolazioni, l'effettiva funzione di barriera al libero scambio di materiale genetico operato dalla zona di ibridazione.

Inoltre, obiettivo principale di questa tesi, i microsatelliti sono stati utilizzati per verificare la dipendenza del flusso genico dalla posizione lungo i cromosomi. Precedenti lavori di citogenetica del *Mus musculus domesticus* (Bidau *et al.*, 2001; Castiglia e Capanna 2002) hanno evidenziato come, durante la meiosi degli ibridi, nelle configurazioni trivalenti vi sia soppressione del *crossing-over* nella zona pericentromerica (figura 1.5). Sulla base di queste conoscenze pregresse è stato deciso di valutare se questa soppressione del *crossing-over* ha, in effetti, conseguenze sul flusso genico della regione pericentromerica del cromosoma rispetto ad altre regioni del cromosoma.

La struttura dell'area di ibridazione, che coinvolge una razza robertsoniana ed una a cariotipo standard, si presta bene per saggiare l'effetto della soppressione della ricombinazione in posizione pericentromerica in quanto negli ibridi sono presenti solamente configurazioni trivalenti e tutte le braccia cromosomiche, ad eccezione dei cromosomi sessuali e dell'autosoma 19, hanno la possibilità di trovarsi in condizione di eterozigosi strutturale semplice.

I loci microsatelliti sono i candidati ideali per verificare questo fenomeno poiché il genoma del topo è stato mappato in modo completo (Dietrich *et al.*, 1996) ed è possibile selezionare i loci in base alla loro posizione nel cariotipo. In questo lavoro sono quindi stati selezionati loci microsatelliti in posizione telomerica e pericentromerica in diverse braccia cromosomiche. Verrà studiata separatamente la struttura genetica dei loci telomerici e pericentromerici per verificare l'esistenza di un flusso genico posizione-dipendente.

L'analisi dei microsatelliti è stata effettuata, inoltre, sull'area di contatto fra le razze cromosomiche CD e ACR. Queste due razze differiscono per la totalità dei loro metacentrici e quindi rappresentano un caso estremo di complessità cromosomica negli ibridi. L'alto livello di incompatibilità cariotipica, la quasi totale assenza di ibridi e la divergenza degli aplotipi mitocondriale, fanno supporre che le due razze abbiano raggiunto un alto livello di isolamento riproduttivo. L'analisi dei microsatelliti verificherà definitivamente l'effettivo stato di differenziamento genetico fra le due razze cromosomiche e l'entità del flusso genico, attuale o pregresso attraverso l'area di contatto.

Nella seconda parte della tesi è stato utilizzato un approccio morfologico. Attraverso la morfometria geometrica, applicata alla mandibola, sono state analizzate le differenze di forma all'interno dell'intero campione. In entrambe le aree di contatto sono state esaminate le variazioni morfologiche esistenti fra gli individui con differenti assetti cariotipici e fra le stesse popolazioni utilizzate nell'approccio molecolare. In questo sarà possibile verificare eventuali correlazioni fra variazioni di forma ed assetto cromosomico e, inoltre, la presenza di clini morfologici nelle due aree.

Il campione delle due zone è stato poi analizzato nella sua totalità, includendo anche una popolazione con cariotipo standard distante dalle aree in esame. In questo modo si potrà discriminare, in modo più efficace, l'effetto del cariotipo sulle variazioni di forma (la capacità di un particolare assetto cromosomico di indurre modificazioni fenotipiche) dall'effetto puramente genetico (la dipendenza fra flusso genico e variazioni di forma). Inoltre, si potrà valutare l'influenza di una componente adattativa.

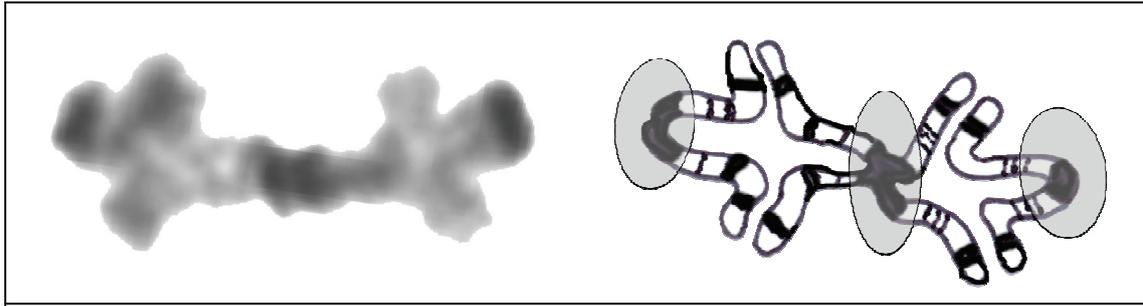


Figura 1.5 - Trivalente con bandeggio C (Castiglia e Capanna, 2002) di un ibrido in eterozigosi strutturale (sinistra) e rappresentazione esplicativa del trivalente stesso durante la meiosi (destra). In grigio sono evidenziate le zone pericentromeriche, soggette a soppressione della ricombinazione.

Figure 1.5 - *C*-banded trivalent (Castiglia e Capanna, 2002) of a hybrid specimen in simple structural heterozygosity (left) and explicative drawing of the same trivalent during meiosis (right). Pericentromeric zones, where recombination is suppressed, are grey highlighted.

2 - MATERIALI E METODI

2.1 - Campione in esame

Gli esemplari utilizzati nelle analisi provengono da due successive fasi di campionamento, la prima si è svolta fra il 1996 e il 2000, la seconda fra il 2003 e il 2005. Il campione è composto da un totale di 263 individui, di cui 158 sono stati catturati nell'area di ibridazione tra la razza CD e la razza a cariotipo standard, situata a nord-est di Roma (17 siti di cattura), 91 nell'area di contatto tra le due razze robertsoniane CD e ACR (17 siti di cattura), pochi chilometri ad ovest di L'Aquila, e 14 nei pressi di Anzio, sul litorale romano, per avere a disposizione una popolazione con cariotipo standard lontana dalle aree in esame.

Come mostrato nelle figure 3.4 e 3.9, le singole località di cattura sono state in alcuni casi raggruppate in base alla vicinanza geografica e alla presenza di continuità negli abitati. Questi gruppi, denominati popolazioni o popolazioni geografiche da qui in avanti (tabelle 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6), sono stati utilizzati per le analisi genetiche e morfologiche i cui risultati sono presentati nel capitolo 3.

In appendice A e B sono riportati il numero diploide di ciascun individuo, la località di cattura e la popolazione di appartenenza.

La cattura degli animali è stata eseguita tramite trappole a cattura singola di tipo "Sherman" (H.B. Sherman) e trappole a cattura multipla di tipo "Tin cat" (Victor).

I topi sono stati sottoposti alle analisi citogenetiche. Frammenti di tessuto muscolare, milza, fegato e reni sono stati asportati e conservati in alcol etilico all'80% per la successiva estrazione del DNA genomico. Le carcasse, private del cranio, destinato ad analisi morfometriche, sono state conservate in alcol etilico all'80% per eventuali ulteriori analisi.

Le informazioni sugli esemplari utilizzati per le analisi citogenetiche, genetiche e morfometriche sono riportate in appendice A e B.

2.2 - Metodi di analisi citogenetica

Uno studio sul flusso genico e sulle variazioni di forma del *Mus musculus domesticus* non può prescindere da un'indagine citogenetica eseguita su ogni esemplare. E' importante, infatti, valutare come, e in che entità, la componente cariotipica influenzi questi parametri per ottenere chiarimenti sul fenomeno dell'evoluzione cromosomica.

Le metafasi somatiche sono state ottenute da midollo osseo seguendo il protocollo di Hsu e Patton (1969). Dalle sospensioni cellulari, conservate in fissativo, sono stati preparati i vetrini e le piastre metafisiche sono state colorate con Giemsa (pH = 7).

I cariotipi standard così ottenuti sono stati sottoposti alla conta dei cromosomi e, quando il numero diploide si discostava da quello tipico delle razze parentali in esame, sono stati sottoposti al bandeggio differenziale di tipo G. Questa tecnica, eseguita con tripsina seguendo il protocollo di Seabright (1971), permette di evidenziare le componenti eucromatiche ricche in basi A-T e quelle ricche in basi G-C che costituiscono i cromosomi ed individuare le braccia cromosomiche (ognuna con un bandeggio specifico) che formano i metacentrici.

Le immagini delle metafasi somatiche bandeggiate sono state rilevate con una fotocamera digitale Photometrics Sensys 1600 montata su un microscopio Olympus (ingrandimento 1000X) tramite il *software* di cattura immagini Iplab (Scanalytics, Inc, version 2.420). I cariotipi sono stati perfezionati graficamente e "montati" utilizzando il *software* di ritocco fotografico Photoshop (Adobe, version 7.0).

2.3 - Selezione dei loci microsatelliti

I loci microsatelliti sono stati selezionati dalla banca dati del *Whitehead Institute for Biomedical Research* (<http://www.genome.wi.mit.edu>) in base alla localizzazione sulle braccia cromosomiche e alla posizione su di esse. La mappatura completa del genoma del topo (Dietrich *et al.*, 1996) ha reso possibile questa procedura; la banca dati fornisce, infatti, la distribuzione dei loci microsatelliti nei diversi cromosomi, la posizione lungo i cromosomi stessi (misurata con l'unità di ricombinazione "*Centimorgan*"), la composizione in coppie di basi e la sequenza dei relativi *primer*. I loci sono nominati "DXMitY" (Davisson, 1996), dove X indica il numero del braccio cromosomico e Y il numero del locus.

Per questo lavoro sono stati utilizzati 12 loci in 6 diverse braccia cromosomiche. La scelta è stata eseguita in base ad una serie di parametri con lo scopo di ottimizzare i costi ed i tempi. Il primo parametro di scelta è stato il precedente utilizzo dei loci in letteratura, poi sono state valutate le temperature di appaiamento (*annealing*) della coppia di *primer* per ogni locus, le temperature medie di *annealing* di ogni coppia di *primer* per tutti i loci ed infine la lunghezza delle sequenze dei loci per poter inserire più di un locus in un pozzetto nella corsa elettroforetica.

Inizialmente sono state analizzate 15 coppie di *primer* corrispondenti a 15 loci. Solo 12 loci sono stati utilizzati nell'analisi genetica (riportati nella tabella 2.1), i restanti 3 sono stati esclusi (vedi il capitolo dei risultati per i dettagli).

Locus	Chr	Coppia di <i>primer</i>	P	Unità di ripetizione	T
D6Mit138	6	F - GCTCTTATTAATGAAGAAGAAGGAGG R - CAAAGAAAAGCATTCAAGACTGC	1.1	(AAAG) _n (AG) _m	57
D6Mit26	6	F - CAAACTTCTTTGAGTGGTTCCC R - CCCATTGCTTCAGCTTCTC	65.6	(AC) _n	56
D9Mit251	9	F - TACCTGAGAATGTATTCTGCGTG R - ATAGGAGAAAAGTTTCATCTTCAATG	3.3	(TG) _n	57
D9Mit52	9	F - TTTCTGAGTCAGCCAAGGCT R - GACTGCTCTTCATGTTTGATGC	69.9	(AC) _n	55
D10Mit75	10	F - TATGAATGTGTATATGTGTATACCCCC R - AAATGCATTGTGGGTGACAT	0.0	(TG) _n	57
D10Mit103	10	F - TATGCCGACAATATTCATTGC R - GCCTCTGCATACATAACCAATACC	76.5	(TG) _n	57
D11Mit74	11	F - AAAACCTGAGTTCGACCCCT R - ATAAAGCCTCATCTACATGGGC	2.2	(AC) _n	57
D11Mit61	11	F - ACCCTTCTCAGCTTACAAGTCC R - GTATCAGAAATCTGGTGCTTCTGG	74.3	(TG) _n	55
D12Mit182	12	F - GTACATAACAATACATCACACAAACGG R - GGCAAGAAAACAGACCAATAGG	2.2	(AC) _n	57
D12Mit30	12	F - TATGTGACTGCAATCCCAGC R - ATGAACACATCATGCCCAGA	41.5	(AC) _n	56
D19Mit94	19	F - AGGTATCCCAGGTCTGCCAT R - AAGGTCCTGAGAGGGAGTATATCA	1.1	(AC) _n	57
D19Mit6	19	F - ATTAGTAAACTGACTCCCATGCG R - CTCATGAGTCCCCTGGGTTA	57.9	(AC) _n	57

Tabella 2.1 - Nome del locus, braccio cromosomico (Chr), sequenza dei *primer* (F = *forward* e R = *reverse*), localizzazione sul cromosoma misurata in centimorgan (P), unità di ripetizione e temperatura di *annealing* (T). In grigio sono evidenziate le informazioni relative ai loci pericentromerici, su sfondo bianco quelle relative ai loci telomerici.

Table 2.1 - Locus name, chromosome arm (Chr), primer sequences (F = *forward* and R = *reverse*), locus position in centimorgan (P), repetition unit and annealing temperature (T). The information about pericentromeric and telomeric loci is respectively grey and white highlighted.

2.4 - Estrazione e amplificazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da tessuto conservato in alcol etilico all'80% (prevalentemente da muscolo e reni, che hanno fornito una resa maggiore rispetto a fegato e milza) tramite un *kit* commerciale per l'isolamento del DNA da tessuto animale, “*QIAamp kit for tissue*” (Qiagen), attenendosi al protocollo della ditta produttrice. Il sistema prevede la digestione del tessuto, preventivamente omogeneizzato, in presenza di proteinasi K, e il successivo impiego di colonnine di separazione che trattengono il DNA in modo selettivo. Il passaggio finale prevede l'eluizione del materiale genetico dalle colonnine con acqua deionizzata e sterilizzata.

Dal DNA totale così ottenuto, sono state isolate ed amplificate le sequenze dei loci microsatelliti tramite reazione di polimerizzazione a catena (PCR). Le amplificazioni dei loci microsatelliti sono state eseguite utilizzando un Thermocycler T1 (Biometra) con il seguente protocollo: iniziale denaturazione a 94°C per 4 minuti, a seguire 30 cicli con denaturazione a 94°C per 1 minuto, *annealing* ad una temperatura compresa fra 55°C e 57°C, a seconda della coppia di *primer* utilizzati (vedi tabella 2.1 per i dettagli), per 45 secondi ed estensione a 72°C per 1 minuto. Infine, sono stati aggiunti al programma 10 minuti di ulteriore estensione a 72°C. Le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 10 µl di soluzione contenente: 100-200 ng di DNA templato, 1 µl 10X tris *buffer*, 0.6 µl MgCl₂ 25mM, 1 µl di dNTP 2,5 mM, 1 µl di ogni *primer* 5 µM (25 ng) e 0.25 U di Taq *polymerase* (Promega).

I prodotti a doppia elica ottenuti tramite PCR non sono stati sottoposti a purificazione, ma sono stati inclusi direttamente nella soluzione utilizzata per la genotipizzazione degli alleli.

2.5 - Elettroforesi e genotipizzazione del DNA

La separazione delle varianti alleliche per ogni locus e per ogni individuo è stata eseguita tramite elettroforesi su gel denaturante di poliaccrilamide al 6.5% all'interno della camera elettroforetica del sequenziatore automatico LI-COR 4200 (LI-COR, Biosciences). Il gel standard, di spessore pari a 0.25 mm, è stato suddiviso in 48 corsie. I pozzetti sono stati caricati con 1 µl di soluzione di semina contenente: 0.35 µl di *loading dye*, 0.10 µl di DNA di ogni campione prelevato dal prodotto della PCR diluito 4 volte con acqua sterile, da 0.55 a 0.25 µl di H₂O a seconda che il pozzetto sia stato caricato rispettivamente con 1, 2, 3 o 4

campioni di DNA. Il sequenziatore ha un *laser* in grado di emettere radiazioni elettromagnetiche nel campo dell'infrarosso su due diverse lunghezze d'onda, 700 e 800 nm. I *primer* dei 12 loci selezionati sono stati marcati in modo da essere rilevati solo da una delle due radiazioni (6 *primer* sensibili ai 700nm, marcatura IRD700, 6 sensibili agli 800nm, marcatura IRD800). Questo ha permesso di caricare fino a 4 diverse combinazioni di individui/loci (per esempio 2 loci di diversa lunghezza marcati IRD700 e 2 di lunghezze comparabili ai precedenti ma con marcatura IRD800). Come risultato viene ridotto in modo significativo il numero di corse elettroforetiche totali evitando letture sovrapposte. Dei 48 pozzetti a disposizione, 40 sono stati caricati con i campioni e 8 con i marcatori di peso molecolare standard forniti dalla LI-COR.

Il *software* del sequenziatore fornisce in *output* un'immagine di tipo *Tif* e, tramite l'ausilio del programma Gene ImagIR (LI-COR, Biosciences), sono stati analizzati i picchi di assorbimento corrispondenti ad ogni individuo per un determinato locus: 1 (omozigote) o 2 (eterozigote) picchi corrispondenti alle forme alleliche del microsatellite (figura 2.2). La determinazione della lunghezza in bp di ciascuna forma allelica è stata effettuata tramite il confronto con i picchi degli standard molecolari (figura 2.1).

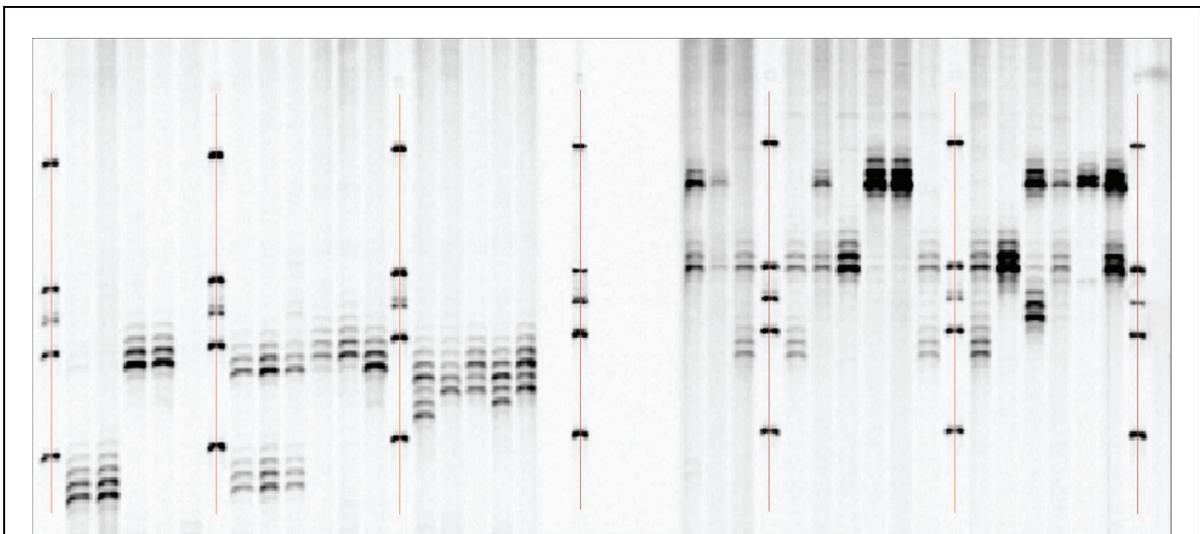
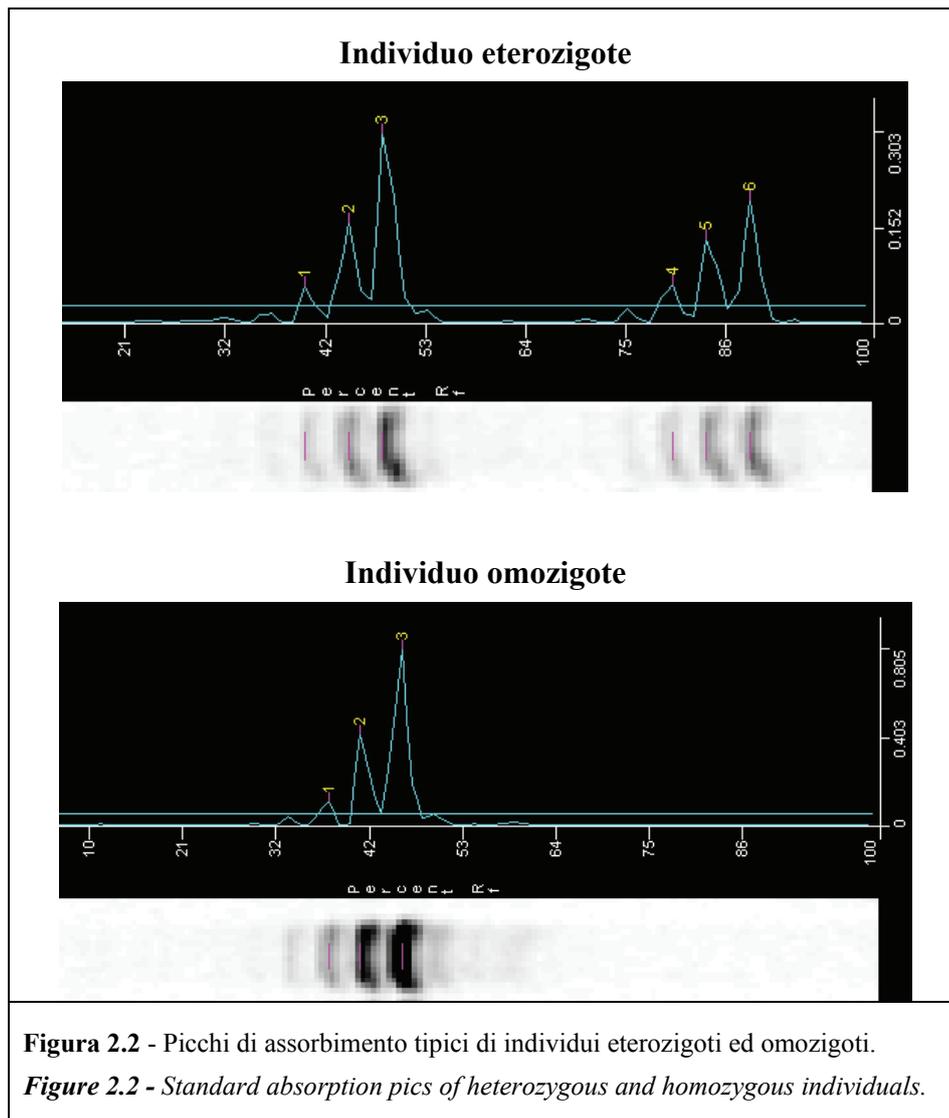


Figura 2.1 - Immagine di una porzione di gel, *output* del sequenziatore automatico LI-COR 4200. Le righe rosse evidenziano le bande dei marcatori di peso molecolare fra le quali sono interposte le bande relative agli alleli dei loci microsatelliti. Il presente gel è stato caricato con un campione di individui per i loci D19Mit94 (sinistra) e D19Mit6 (destra), entrambi con marcatura IRD700.

Figure 2.1 - Image of a gel fraction, *output* of the automatic sequencer LI-COR 4200. The red lines show the size standard molecular markers bands. Between them, the bands of the loci microsatellite alleles are shown. This gel was charged with a sample of specimens for the loci D19Mit94 (left) and D19Mit6 (right), both IRD700 labelled.



2.6 - Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state applicate alle due aree in esame classificando il campione in popolazioni geografiche (vedi paragrafo 2.1) e, per l'analisi gerarchica AMOVA, prendendo in considerazione le informazioni cariotipiche. In quest'ultimo caso i "gruppi cromosomici" (razze parentali ed ibridi) saranno il risultato di un raggruppamento di più popolazioni geografiche (tabelle 2.2, 2.3 e 2.4).

Gli esemplari, e le relative informazioni genetiche e geografiche, sono stati organizzati in un *database* e, tramite l'applicazione MStool per Microsoft Excel (Parks, 2001), è stato eseguito il calcolo delle frequenze alleliche per ogni popolazione. Dalla distribuzioni di tali

frequenze sono stati creati degli appositi istogrammi. Questo programma ha inoltre permesso di preparare i *file di input* per alcuni dei principali *software* di elaborazione dati.

2.6.1 - Analisi della variabilità intrapopolazionale

Il programma Genetix 4.05 (Belkhir *et al.*, 2001) è stato utilizzato per calcolare l'eterozigosità osservata (H_o), l'eterozigosità attesa (H_e) e il numero medio di alleli per locus (*MNA*).

L'eterozigosità osservata è stata calcolata tramite la seguente formula:

$$H_o = \frac{n^{\circ} \text{eterozigoti}}{n}$$

dove n corrisponde al numero di esemplari analizzati.

L'eterozigosità media osservata ($\overline{H_o}$) su tutti i loci è stata calcolata tramite la seguente formula:

$$\overline{H_o} = \frac{\sum_{j=1}^r H_{o_j}}{n_j r}$$

dove n_j è il numero dei campioni analizzati al locus j , mentre r è il numero di loci analizzati.

L'eterozigosità osservata è stata confrontata con l'eterozigosità attesa (H_e) sulla base dell'equilibrio di Hardy-Weinberg. Il calcolo di questa, eseguito per ogni locus, è stato basato sulla correzione proposta da Nei (1987) per evitare l'effetto del campionamento ($H_{unbiased}$, in seguito nominata sempre H_e):

$$H_e = \frac{2n(1 - \sum \hat{x}_i^2)}{2n - 1} \quad \text{con} \quad \hat{x}_i = \hat{X}_{ii} + \frac{\sum_{i \neq j} \hat{X}_{ij}}{2}$$

dove \hat{X}_{ii} è la frequenza dell'omozigote A_iA_i e \hat{X}_{ij} è la frequenza dell'eterozigote A_iA_j nei campioni analizzati.

L'eterozigosità media attesa (per tutti i loci) è stata calcolata come:

$$\overline{H_e} = \frac{\sum_{i=1}^r H_j}{r}$$

dove H_j è l'eterozigosità attesa calcolata per il locus j ed r è il numero dei loci.

Il numero medio di alleli per locus è stato calcolato come:

$$MNA = \overline{A} = \frac{\sum_{j=1}^r A_j}{r}$$

dove A_j è il numero di alleli al locus j ed r è il numero di loci.

Il programma Genepop 3.4 (Raymond e Rousset, 1995) è stato utilizzato per saggiare se le popolazioni naturali seguano o meno l'equilibrio di Hardy-Weinberg. La significatività delle deviazioni da tale equilibrio è stata verificata per ciascun locus in ogni popolazione tramite un *test* esatto basato sul metodo delle catene di Markov (Guo e Thompson, 1992) utilizzando i seguenti parametri: 5000 *permutations*, 2000 *dememorisation steps* and 500 *batches*. Data la presenza di *test* multipli è stata applicata la correzione di Bonferroni sulla soglia di significatività adottata ($p = 0.05$). Questa è stata quindi abbassata a $p = 0.0004$ per l'area di ibridazione (120 *test*) e a $p = 0.0010$ per l'area di contatto (48 *test*). Una popolazione si discosta in modo significativo dall'equilibrio di Hardy-Weinberg quando il corrispondente valore di p è uguale o minore alla soglia prestabilita.

Per analizzare l'indipendenza dei loci microsatelliti, Genepop 3.4 è stato utilizzato per calcolare il *linkage disequilibrium* per tutte le coppie di loci. La significatività dell'ipotesi nulla ($H_0 =$ "I genotipi ad un locus sono indipendenti dai genotipi ad un altro locus") è stata saggiata su tabelle di contingenza attraverso un *test* esatto di Fisher basato sulle catene di Markov utilizzando i seguenti parametri: 5000 *permutations*, 2000 *dememorisation steps* and 500 *batches*. Dopo l'applicazione della correzione di Bonferroni alla soglia di significatività

adottata ($p = 0.05$) sono stati ottenuti i seguenti valori: area di ibridazione (660 *test*) $p = 0.00007$, area di contatto (168 *test*) $p = 0.00029$. L'ipotesi nulla viene rigettata in presenza di valori di p uguali o minori alle soglie prestabilite.

2.6.2 - Analisi del differenziamento tra le popolazioni/razze

La struttura di popolazione è stata esaminata tramite la statistica F di Wright (1951, 1965), dove F indica l'indice di fissazione, misura della riduzione di eterozigotità dovuta ad inincrocio. Wright sviluppò tre indici per valutare la suddivisione di una popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg in più sottopopolazioni: F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} .

Il parametro F_{IS} , coefficiente di consanguineità, misura le deviazioni, in termini di eterozigotità, di una sottopopolazione in esame e la stessa in condizione di panmissia:

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_o}{H_s}$$

dove H_s e H_o indicano rispettivamente la media delle eterozigosi attese e osservate calcolate per ogni sottopopolazione;

L'indice F_{IS} varia da -1 a +1; valori negativi indicano eccessi di eterozigoti (*outbreeding*), valori positivi eccessi di omozigoti (*inbreeding*).

Il parametro F_{IT} , usato raramente, misura in termini di eterozigosi la variabilità totale dell'intero campione:

$$F_{IT} = \frac{H_t - H_o}{H_s}$$

dove H_t indica l'eterozigotità totale dell'intera popolazione.

Il parametro F_{ST} , indice di fissazione, misura la riduzione di eterozigotità di una sottopopolazione dovuta alla deriva genetica casuale ed è in grado di fornire una stima della distanza fra sottopopolazioni:

$$F_{ST} = \frac{Ht - Hs}{Ht}$$

L'indice F_{ST} varia da 0 (assenza di differenziamento fra le sottopopolazioni) e 1 (differenziamento massimo). Questo fornisce inoltre una stima indiretta del flusso genico fra sottopopolazioni:

$$F_{ST} = \frac{1}{4Nm + 1}$$

dove m indica la frazione di migranti per popolazione e Nm il numero di individui che migrano da una popolazione ad un'altra ad ogni generazione.

In questo lavoro gli indici di Wright sono stati calcolati utilizzando parametri analoghi appositamente corretti per essere adattati a casi di studio specifici. In particolare la sottostruttura di popolazione è stata indagata tramite: *theta* (θ), estimatore di F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984) in grado di correggere errori dovuti a campionamenti incompleti e *rho* (ρ), estimatore di R_{ST} (Slatkin, 1995), analogo dell'indice F_{ST} corretto assumendo che il tasso di mutazione dei microsatelliti segua un modello di tipo *stepwise* piuttosto che un modello di tipo *infinite alleles*. In questo lavoro, una maggiore attenzione è stata alla statistica F piuttosto che alla statistica R in quanto, sebbene il modello di evoluzione dei microsatelliti si adatti meglio ad un modello evolutivo di tipo *step-wise*, è stato evidenziato come, specialmente in presenza di popolazioni di piccole dimensioni ($n \leq 10$) e di un basso numero di alleli ($a < 20$), l'indice F_{ST} è in grado di fornire stime più corrette nelle analisi di genetica di popolazione (Gaggiotti *et al.*, 1999). Inoltre, è stato utilizzato l'indice D (Nei, 1978), in grado di calcolare la distanza genetica fra popolazioni, specificamente studiato per loci multiallelici e G_{ST} (Nei, 1973), indice che misura la distanza genetica fra popolazioni tenendo conto della diversità genetica totale dell'intero campione.

Per il calcolo di θ è stato utilizzato il *software* Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). I livelli di significatività dei valori di F_{ST} sono stati calcolati con il metodo delle catene di Markov in un *test* esatto per la differenziazione delle popolazioni utilizzando i seguenti parametri: 5000 *permutations*, 2000 *dememorisation steps* and 500 *batches*. La correzione di Bonferroni, applicata alla soglia di significatività adottata ($p = 0.05$), ha prodotto i nuovi valori

utilizzati nell'analisi sull'area di ibridazione e di contatto, rispettivamente $p = 0.001$ (45 *test*) e $p = 0.003$ (15 *test*).

Per il calcolo di ρ è stato utilizzato il programma RSTCALC (Goodman, 1997). I livelli di significatività dei valori di R_{ST} sono stati calcolati tramite una procedura di *bootstrap* utilizzando 1000 permutazioni e 1000 *bootstraps*. I valori di p sono gli stessi adottati nel calcolo della significatività di θ .

Un ulteriore stima della distanza genetica fra le popolazioni è stata effettuata tramite una procedura fornita dal *software* Genepop 3.4. L'ipotesi nulla da saggiare è l'assenza di differenziazione genica e genotipica tra le popolazioni. I livelli di significatività sono stati calcolati tramite un *test* esatto di Fisher basato sulla probabilità come descritto da Raymond e Rousset (1995) per il *test* genico, e tramite un *test* esatto basato sulla verosimiglianza (Goudet *et al.*, 1996) per il *test* genotipico. I valori di p sono gli stessi adottati nel calcolo della significatività di θ e ρ .

Sia in questo *test* che nelle analisi di θ e ρ , valori di p minori dei valori soglia adottati indicano differenze significative fra le popolazioni. Genepop è stato poi utilizzato per calcolare il numero di migranti per generazione secondo il metodo degli alleli esclusivi descritto da Barton e Slatkin (1986).

Genetix è stato utilizzato per calcolare la distanza genetica (D) mentre per il calcolo di G_{ST} fra le popolazioni è stato utilizzato il *software* FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001).

L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA), implementata nel programma Arlequin, è stata utilizzata per valutare l'esistenza di una struttura genetica all'interno del campione. La proporzione di variazione genetica totale, ripartita in componenti di covariazione in relazione alle differenze "fra gruppi di popolazioni", "fra popolazioni all'interno dei gruppi" e "fra individui all'interno delle popolazioni", è stata stimata tramite la statistica F di Wright. La significatività dell'indice di fissazione relativo ai tre livelli di analisi (fra gruppi: F_{CT} ; fra popolazioni: F_{SC} ; all'interno delle popolazioni: F_{ST}) è stata verificata attraverso un *test* non parametrico descritto da Excoffier *et al.* (1992). In questo lavoro le popolazioni geografiche hanno costituito un livello di analisi, un ulteriore livello gerarchico è stato creato tramite il raggruppamento di più popolazioni in base alla struttura cromosomica ad esse associata.

Il *software* GeneClass 1.0.02 (Cornuet *et al.*, 1999) è stato utilizzato per assegnare gli individui inclusi nello studio alle differenti popolazioni geografiche e alle differenti razze cromosomiche. Per ogni gruppo, per esempio una popolazione, il programma simula una popolazione di grandi dimensioni con genotipi multilocus in accordo con le frequenze alleliche nel campione. Quindi, GeneClass calcola una stima della probabilità di ogni singolo individuo di appartenere ad ognuna delle popolazioni in esame. Ogni individuo è assegnato alla popolazione dove la probabilità di “appartenenza” è più alta. L’analisi è stata eseguita tramite un algoritmo di tipo *bayesiano* secondo un metodo basato sulla verosimiglianza. Sono state condotte 10.000 simulazioni per ogni popolazione. Nessun assegnamento è stato effettuato se la probabilità di appartenenza degli individui ad una delle popolazioni è risultata inferiore al 5%. Tramite questo approccio è possibile verificare la consistenza dei raggruppamenti di individui ed avere una misura indiretta del flusso genico fra le popolazioni in esame.

Per visualizzare i rapporti reciproci fra le popolazioni sono stati costruiti degli alberi di massima verosimiglianza in base alle frequenze alleliche delle popolazioni stesse tramite il programma CONTML fornito con il pacchetto Phylip 3.2 (Felsenstein, 1989).

Il programma STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) è stato utilizzato per “dedurre” la struttura di popolazione dai dati genetici. Il *software* è in grado di identificare la presenza di una strutturazione genetica all’interno di un insieme di dati senza utilizzare l’informazione della suddivisione “a priori” in popolazioni. L’approccio, in questo caso, è diverso dai metodi descritti precedentemente, dove le analisi vengono effettuate su gruppi di individui preformati, nel caso di questo lavoro popolazioni geografiche e gruppi cromosomici (razze cromosomiche ed ibridi). STRUCTURE assume un modello con un determinato numero di popolazioni (K), quindi assegna i genotipi relativi ad ogni individuo alle K differenti popolazioni in modo tale che non ci sia *linkage disequilibrium* fra coppie di loci e tutte le popolazioni siano in equilibrio di Hardy-Weinberg. Dopo varie corse con differenti valori di K è stato possibile calcolare $Pr(D/K)$, la probabilità dei dati ottenuti dato un determinato K ; viene quindi scelto il K più probabile. In questo lavoro, l’analisi è stata condotta utilizzando il modello “*admixture*”, implementato nel programma STRUCTURE, tramite una procedura di calcolo di tipo *bayesiano* con 100.000 iterazioni. Il risultato ottenuto è una stima del numero di popolazioni che meglio si adatta all’insieme dei dati, da comparare con le popolazioni reali.

Per saggiare la correlazione fra distanza genetica e distanza geografica è stato effettuato un *test* di Mantel (1967) tramite la *subroutine* “Isolde” del programma Genepop. Come

descritto da Rousset (1997), è stato confrontato il valore $F_{ST}/(1-F_{ST})$ con il logaritmo naturale della distanza.

2.6.3 - Analisi del flusso genico differenziale

Per verificare la presenza di un flusso genico dipendente dalla posizione sul braccio cromosomico sono state eseguite analisi basate sulla statistica F , R e sulla distanza genetica applicata ad ognuno dei loci e su due insiemi di dati contenenti rispettivamente i loci pericentromerici e telomerici.

L'analisi differenziale è stata eseguita, inoltre, tramite l'analisi gerarchica AMOVA eseguita su ogni locus e tramite la costruzione di due distinti alberi di massima verosimiglianza utilizzando le frequenze alleliche delle popolazioni calcolate sui due insiemi di dati descritti.

Infine, è stato eseguito un *test* di assegnazione sugli individui appartenenti alle popolazioni in esame caratterizzati alternativamente dai loci pericentromerici e telomerici.

Nelle analisi dove sono stati utilizzati i due insiemi di dati descritti, i loci del cromosoma 19, l'unico mai coinvolto in fusioni robertsoniane, sono stati esclusi.

2.7 - Tecniche di morfometria geometrica

Le variazioni morfologiche sono state analizzate attraverso la tecnica della morfometria geometrica (Bookstein, 1991; Rohlf e Marcus, 1993). Il vantaggio di questo approccio rispetto alla morfometria tradizionale, deputata all'analisi di distanze tra punti, è quello di prendere in considerazione le relazioni spaziali che intercorrono fra gli stessi o altri punti ma rilevati sotto forma di coordinate cartesiane nelle due o tre dimensioni (detti anche "punti omologhi" e qui di seguito riportati come *landmark*, secondo la definizione tradizionalmente accettata) su oggetti biologici, consentendone sia l'analisi statistica che la rappresentazione, sotto forma grafica, delle differenze di forma che detti punti rappresentano (Bookstein, 1989, 1991; Rohlf e Marcus, 1993).

Con questo nuovo approccio algebrico-geometrico è possibile, inoltre, scomporre la "forma" (*form*) di un oggetto in una componente "dimensione" o "taglia" (*size*) ed in una,

puramente geometrica, “*conformazione*” (*shape*). Le due componenti vengono quindi analizzate separatamente o congiuntamente.

Il grande vantaggio della morfometria geometrica è, dunque, quello di consentire l’analisi numerica e statistica delle proprietà geometriche della forma (nelle sue componenti “*taglia*” e “*conformazione*”) e la visualizzazione, in forma grafica, delle differenze che tra loro intercorrono tramite la sovrapposizione delle coordinate della conformazione.

La procedura opera tramite 1) una standardizzazione delle coordinate cartesiane, in modo da condurle tutte a taglia unitaria, ottenendo così delle “pure configurazioni geometriche”; 2) una loro traslazione sul centroide, in modo da sovrapporre l’una sull’altra, e 3) la loro successiva rotazione, secondo un determinato criterio; in questo modo sarà possibile sia a- la visualizzazione delle differenze della conformazione e la loro localizzazione (dopo la sovrapposizione) e b- ottenere due nuovi insiemi di descrittori della forma: la taglia (definita di seguito come *centroid size*) e la configurazione (l’insieme delle nuove coordinate così trasformate) su cui è possibile effettuare ogni sorta di analisi statistica.

Infine, con i lavori di Bookstein (1989, 1991) è divenuto possibile coniugare quello che è l’approccio puramente statistico e noto come morfometria multivariata, all’idea originale di D’Arcy Thompson (1917) che aveva tentato, senza però essere in grado di fornirne le basi concettuali, di rappresentare le differenze di forma sotto la forma grafica di griglie di deformazione. Il metodo, detto del *Thin Plate Spline*, presenta una serie di vantaggi sia in termini statistici che di rappresentazioni grafiche (vedi oltre).

2.7.1 - Taglia

E’ necessario e opportuno definire qui un criterio utilizzato per la stima delle dimensioni che tenga conto delle sue proprietà geometriche nello spazio. Il criterio più semplice è quello di definire come le coordinate cartesiane utilizzate per rilevare una forma nello spazio (indipendentemente da quante siano e se si tratti di uno spazio a tre o due dimensioni) aumentino o diminuiscano le loro distanze relative. Operazionalmente, si identifica il centroide di ogni oggetto (il centro geometrico di ogni forma) e si calcolano le distanze tra questo e ogni *landmark*. La stima ottimale delle dimensioni (qui definita come *centroid size*) viene quindi identificata dalla radice quadrata della sommatoria delle distanze al quadrato tra il centroide e ogni punto omologo secondo la formula definita da Bookstein (1991):

$$\sqrt{\sum_1^L (y_i - x)^2}$$

Piuttosto che una misura lineare tra due punti, come la lunghezza massima o l'altezza, il *centroid size* costituisce una stima sintetica delle dimensioni di un organismo in tutte le direzioni possibili secondo cui questo si estende nello spazio, dimensioni rappresentate dagli n *landmark* che lo descrivono.

Le dimensioni di ogni individuo vengono così rappresentate da un unico scalare.

2.7.2 - Configurazione

Vi sono diversi metodi per la sovrapposizione di coordinate, alcuni più semplici, altri più complessi, che spesso conducono a risultati simili se non identici, ma che godono di proprietà algebriche differenti, ovvero sia la visualizzazione grafica che la stima statistica delle differenze può trovare seri limiti. Tra questi, le *shape coordinates* (o coordinate della forma; Bookstein, 1991), il metodo del *Resistant Fit generalizzato* (Rohlf e Slice, 1990), il metodo di Procuste (detto anche *metodo dei minimi quadrati generalizzato* o GPA “*Generalized Procrustes Analysis*”, *analisi di Procuste generalizzata*; Rohlf e Slice, 1990) e altri di minore importanza.

Attualmente, sono state comprese a fondo le proprietà di ciascun metodo e la scelta oggi è orientata verso il metodo di Procuste o GPA per le sue proprietà peculiari. Secondo il metodo, dalle configurazioni dei *landmark* di un insieme di oggetti, viene estrapolata una configurazione media, chiamata configurazione di consenso, tramite normalizzazione, traslazione e rotazione delle configurazioni; questa opera in modo tale da identificare le distanze quadratiche minime tra *landmark* omologhi tramite un'operazione interattiva che termina al momento in cui i risultati convergono.

Il metodo di Procuste (GPA)

Il *metodo di Procuste* (Rohlf e Slice, 1990) compie dunque una sovrapposizione tra due conformazioni trovando una soluzione che minimizza le distanze quadratiche tra i loro corrispondenti punti omologhi. La procedura si svolge attraverso i seguenti passi:

siano X_1 e X_2 matrici $p \times k$ che rappresentano le coordinate dimensionali di p punti di due configurazioni. Si deve trasformare X_2 in modo tale che la somma delle differenze quadratiche fra i corrispondenti elementi di X_1 e X_2 siano le minori possibili.

1. Si centrino le coordinate di ciascun oggetto sull'altro sottraendo le coordinate del suo centroide dalle corrispondenti coordinate x e y di ciascun punto omologo, risultando nelle matrici X'_1 X'_2 che contengono i valori dello scarto di ogni media lungo ogni asse. L'operazione richiede di moltiplicare \mathbf{X} per $(\mathbf{I} - \mathbf{P})$, dove \mathbf{I} è la matrice di identità $p \times p$ e \mathbf{P} è una matrice $p \times p$ con tutti gli elementi eguali a $1/p$.
2. Si normalizzino X_1 e X_2 a dimensione unitaria, dove \mathbf{X} è la matrice dei valori originali delle coordinate x , y che definiscono i punti omologhi. In questo modo avremo configurazioni di punti in cui non è più presente la taglia.
3. Si ruoti la seconda configurazione rispetto alla prima in modo da ottenere la migliore approssimazione, in modo tale che $\mathbf{X}_2^* = \mathbf{X}_2' \mathbf{H}$ abbia il minimo scarto quadratico dalla localizzazione dei corrispondenti punti della **configurazione di consenso** (o configurazione media: questa rappresenta la media fra tutti i corrispondenti punti omologhi). Per due dimensioni, la matrice \mathbf{H} corrisponde alla matrice di rotazione

$$(0.1) \quad \mathbf{H} = \begin{bmatrix} \cos\vartheta & -\sin\vartheta \\ \sin\vartheta & \cos\vartheta \end{bmatrix}$$
4. Si salvino le matrici X'_1 X'_2 con i nuovi valori. Questi possono essere messi in grafico per mostrare le differenze di conformazione e analizzati statisticamente.

Come abbiamo detto, la migliore soluzione all'analisi statistica delle configurazioni e alla rappresentazione grafica delle differenze di forma (come griglie di deformazione) è quella del *Thin Plate-Spline*. Il metodo si basa, come punto di partenza, sul **GPA**.

Il calcolo del Thin Plate-Spline

Si considerino due configurazioni, A e B, con punti nelle due o tre dimensioni, con A che costituisce il riferimento e B che deve essere fatto coincidere con A. Quindi si utilizzi per le coordinate (a_{ix}, a_{iy}, z_i) una funzione di interpolazione per traslare le coordinate nella direzione della x ; si ripeta lo stesso procedimento per la y .

Alla base del *Thin-Plate Spline* vi è la funzione U , soluzione fondamentale dell'equazione biarmonica:

$$z(x, y) = -U - (r) = -r^2 \ln r^2$$

dove $r = (x^2 + y^2)^{1/2}$ costituisce la distanza dall'origine cartesiana.

La superficie descritta da questa funzione ha una conformazione quasi sferica, (con coordinate 0,0,0 e un progressivo aumento (tangente ad un piano) rappresentato dalla circonferenza con raggio = 1 e origine coincidente.

La funzione $U(r)$ soddisfa l'equazione:

$$\Delta^2 U = \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right)^2 U \partial \delta_{(0,0)}$$

La parte destra dell'espressione è proporzionale alla "funzione generalizzata" $U \partial \delta_{(0,0)}$ che è 0 in ogni punto ad eccezione dell'origine ma ha un integrale = 1.

La principale funzione del Thin-Plate spline è quella visiva, che consente di visualizzare l'interpolazione tra punti omologhi come uno spostamento di un'intera area rispetto ad un'altra, ma anche quella di produrre nuove coordinate della conformazione più appropriate per analisi statistiche (vedi oltre). Dobbiamo definire un nuovo insieme di variabili che descrivano lo spazio originale dei dati (nient'altro che una rotazione rigida) ma che sono rappresentate da un numero = $2K - 4$ (per punti a 2 dimensioni), o da $KM - 1 - M(M - 1)^{1/2}$, dove K è il numero dei punti e M il numero di dimensioni. Nelle due dimensioni e per 10 punti il numero di variabili diviene 16. Inoltre, queste presentano il notevole vantaggio rispetto ai residui del GPA di poter essere utilizzate per tutti i saggi statistici multivariati. Infine, utilizzando per un qualsiasi saggio statistico i residui del GPA o queste nuove variabili si ottengono esattamente gli stessi risultati

Per due dimensioni la funzione del TPS è:

$$(0.2) \quad \begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix} = \mathbf{A} \begin{bmatrix} \mathbf{1} \\ \mathbf{x} \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} + \sum_{j=1}^p \mathbf{n}_j U(r_j)$$

Dove x e y costituiscono le coordinate dei punti del consenso, x' e y' costituiscono le coordinate dei punti risultanti nello spazio dell' i -esimo campione. \mathbf{A} è una matrice $k \times (k+1)$ di parametri che definisce la traslazione, rotazione, scorrimento (trasformazione affine). $U(r_j)$ è la funzione $r_j^2 \ln r_j^2$, dove r_j corrisponde alla distanza tra un punto (x, y) nello spazio del consenso e l' i -esimo punto del consenso. \mathbf{n}_j corrisponde al numero di vettori k -dimensionali dei parametri che definiscono la trasformazione non-affine.

Il passo successivo riguarda la identificazione di una **matrice dell'energia di torsione** (*bending energy*), espressa in autovettori decrescenti, che fornisca l'informazione circa i diversi livelli di deformazione della lastra o griglia su cui giace la conformazione di consenso.

I passi sono i seguenti:

i parametri $k(k+1) + kp$ necessari per trasformare le coordinate dei punti del consenso in quelli di ciascun i esimo campione sono:

$$\begin{aligned} & \mathbf{L}_p^{-1} \\ & \mathbf{A}_i = \mathbf{X}_i \mathbf{L}_q^{-1} \quad \text{e} \\ & \mathbf{N}_i = \mathbf{X}_i \mathbf{L}_p^{-1} \end{aligned}$$

Dove \mathbf{X} è la matrice $k \times p$ delle coordinate dell' i esimo campione, $\mathbf{X}_i \mathbf{L}_q^{-1}$ costituisce il blocco $p \times p$ in alto sulla sinistra dell'inverso della matrice \mathbf{L} (Bookstein, 1989; Rohlf, 1993) denominata **matrice dell'energia di torsione**; \mathbf{L}_q^{-1} costituisce il blocco superiore destro $p \times (k+1)$ dell'inverso di \mathbf{L} ; \mathbf{N}_i è una matrice $k \times p$ in cui le colonne corrispondono ai vettori \mathbf{n}_j della funzione TPS.

Il primo parametro $k(k+1)$ (gli elementi della matrice \mathbf{A}_i) descrive le differenze uniformi. Il secondo parametro kp , quello non-affine, \mathbf{N}_i , descrive le differenze fra un campione e il consenso tramite la somma delle deformazioni non lineari della configurazione; corrisponde a deformazioni localizzate. I *principal warps* (Bookstein, 1989) costituiscono questa matrice di autovalori (ciascuno dei quali rappresenta l'**energia di torsione** in ordine decrescente rispetto alla localizzazione dei punti - vicina o lontana - compresi nello spazio tangente e definito dalla componente non affine del TPS. Sono calcolati tramite decomposizione della matrice dell'energia di torsione:

$$\mathbf{L}_p^{-1} = \mathbf{E} \mathbf{\Lambda} \mathbf{E}^t$$

dove \mathbf{E} è una matrice $p \times p$ degli autovettori e \mathbf{E}^t sono gli elementi diagonali della matrice degli autovalori (energia di torsione).

Va tenuto presente che i *principal warps* (Bookstein, 1898, 1991) non sono altro che la definizione di vettori ortogonali tra loro, la cui origine corrisponde al consenso, e che definiscono nello spazio nuovi assi che altro non sono che una rotazione rigida degli originali.

Come esprimere i parametri TPS relativi a ciascun individuo compreso nel campione? Come trasportare il campione nello spazio definito dai *principal warps*? Si è rivelato più conveniente esprimere i parametri del TPS di ciascun esemplare nei termini dei *principal warps* rispetto alle coordinate originali. L'operazione conduce alla definizione di una nuova

matrice, \mathbf{W} , dei *Partial Warps* (Bookstein, 1989, 1991), ottenuta dalla proiezione normalizzata delle coordinate x, y delle deviazioni degli n oggetti dal consenso rispetto ai principal warps. I partial warps corrispondono alla trasformazione non affine della funzione TPS che trasforma le coordinate del consenso, \mathbf{X}_c , in quelle di un qualsiasi esemplare \mathbf{X}_i . Il prodotto di ogni riga $\mathbf{V}_i = \mathbf{X}_i - \mathbf{X}_c$ con $p - k - 1$ colonne di \mathbf{E} corrisponde agli autovalori maggiori di 0 (componente non affine) e che costituiscono la matrice dei punteggi dei partial warps.

La matrice \mathbf{W} dei partial warps viene ottenuta nel modo seguente:

$$\mathbf{W} = \frac{1}{\sqrt{n}} \mathbf{V}_i \mathbf{E} \mathbf{\Lambda}^{-\partial/2}$$

La PCA effettuata su \mathbf{W} viene detta analisi dei *Relative Warps* (Rohlf, 1993).

La proprietà specifica della GPA rispetto agli altri metodi è quella di collocare le configurazioni di *landmark* all'interno di uno spazio multidimensionale e multicurvilineo denominato *spazio della configurazione* o “*spazio di Kendall*” (Kendall, 1984; Rohlf, 1999). In questo spazio le differenze morfologiche fra gli oggetti in fase di studio sono rappresentate dalle distanze di Procuste, che possono essere calcolate sia come la sommatoria delle distanze fra tutti i punti omologhi di due configurazioni sia come la distanza geodesica delle due stesse configurazioni nello spazio della forma $1/\cos(\rho)$, dove ρ è costituito dall'angolo formato dai due raggi che uniscono le due configurazioni. Questa duplice proprietà delle distanze di Procuste rappresenta quindi sia le differenze di conformazione che la posizione (distanza) degli individui nello spazio della forma.

Tuttavia, poiché oggi non ci sono ancora a disposizione strumenti analitici e statistici per operare in uno spazio multicurvilineo, le configurazioni devono essere proiettate in uno spazio euclideo che ne consenta l'analisi tramite gli strumenti analitici statistici a nostra disposizione (tutta l'algebra e la statistica è stata, infatti, sviluppata per spazi euclidei). Per questa ragione, le configurazioni dei punti vengono proiettate in uno spazio euclideo tangente allo spazio di Kendall multicurvilineo. Viene tralasciata qui la procedura utilizzata per la proiezione, ma si sottolinea il fatto che il punto di tangenza tra i due spazi è rappresentato dal *consenso*. In questo modo viene perduta parte dell'informazione contenuta nello spazio della forma, ma è stato dimostrato da una serie di studi che questa discrepanza è insignificante ai fini di un'analisi statistica (Marcus *et al.*, 2000.).

I descrittori della forma così ottenuti consentono una diminuzione dei gradi di libertà e quindi una semplificazione dell'analisi statistica e una visualizzazione sotto forma di griglie di

deformazione delle differenze di forma. Tali descrittori sono contenuti nella *weight matrix* definita da Rohlf (1993). Data la complessità della procedura, ma soprattutto per lo spazio necessario per la sua descrizione analitica (in questa sede limitato), si rimanda a Bookstein, 1989, 1991; Rohlf, 2000; Rohlf and Bookstein, 1990; Goodall 1991 (vedi anche oltre per l'estrazione della *weight matrix* e l'utilizzo dei vari parametri detti “*warps*”).

2.7.3 - Analisi morfometriche

In questo lavoro sono stati rilevati 15 *landmark* sulla regione labiale della mandibola sinistra di 207 esemplari di *Mus musculus domesticus* assolutamente integre (appendice B). I *landmark* sono stati prelevati su immagini digitalizzate, utilizzando il programma TPSDIG (Rohlf, 2006a). Le immagini sono state acquisite tramite una fotocamera digitale Nikon D100 con teleobiettivo macro Nikon 105 mm. La distanza fra l'obiettivo e il portaoggetti, dove sono state posizionate le mandibole, è stata tarata a 53 cm, misura utilizzata nella raccolta delle immagini dell'intero campione.

I *landmark* così ottenuti sono stati normalizzati, ruotati e traslati secondo la procedura GPA e la *weight matrix* ed il *centroid size* sono stati calcolati tramite il *software* TPSRELW (Rohlf, 2005b).

Per quanto riguarda la forma, è stata condotta l'analisi delle componenti principali sulla *weight matrix (relative warp analysis)* per visualizzare la maggior parte dell'intera varianza del campione su assi ortogonali (Rohlf, 1993).

La *weight matrix* è stata anche sottoposta all'analisi della varianza multivariata (MANOVA) secondo il modello lineare generalizzato (GLM). In questa analisi sono state stimate le differenze di forma fra gruppi cromosomici (razze cromosomiche ed ibridi), fra popolazioni geografiche e fra sessi; la MANOVA è stata inoltre utilizzata per saggiare le interazioni fra i tre effetti appena descritti.

E' stata condotta, inoltre, un'analisi delle variate canoniche (CVA) che permette di individuare i vettori descrittori della forma che massimizzano le differenze fra gruppi scelti a priori.

La MANOVA e la CVA sono state effettuate tramite il programma SAS 8.02 (SAS Institute), mentre l'analisi dei *relative warp* è stata condotta utilizzando il programma TPSRELW.

La correlazione fra la variazione della forma e la variazione ambientale è stata analizzata tramite un'analisi dei minimi quadrati parziali (*Partial Least Square* o PLS; Rohlf e Corti, 2000) che permette di verificare la covariazione fra la forma e parametri ecologici, geografici, fisiologici, ecc. Il PLS genera due vettori, uno che descrive la variazione di forma ed uno che descrive la variazione delle variabili ambientali (ecologiche, geografiche ecc.). Il primo vettore del primo insieme è appaiato al primo vettore del secondo e la corrispondente correlazione è verificata tramite un *test* di permutazioni. L'analisi procede fino ad appaiare l'*i*-esimo vettore del primo insieme con l'*i*-esimo vettore del secondo insieme. I vettori non sono necessariamente ortogonali fra loro (presentando un vantaggio rispetto all'analisi della correlazione canonica; Rohlf e Corti, 2000) e vengono estratti per massimizzare la covarianza fra i due insiemi di variabili. Il PLS è stato eseguito tramite il programma TPSPLS (Rohlf, 2005a). Come variabili descrittivi dell'ambiente sono state utilizzate la latitudine, la longitudine e l'altitudine.

La differenza di taglia fra gruppi cromosomici, popolazioni geografiche e sessi, e fra le interazioni di questi effetti, sono state analizzate tramite l'analisi della varianza univariata (ANOVA) condotta sul *centroid size*. L'ANOVA è stata eseguita tramite il programma SAS.

La correlazione fra taglia e le variabili ambientali utilizzate nel PLS è stata analizzata tramite una regressione semplice fra il *centroid size* e le singole variabili tramite il programma NTSYSpc 2.20f (Rohlf, 2006b)

L'analisi morfometrica della forma è stata condotta sull'intero insieme di *landmark* e su due sottoinsiemi relativi alla "regione dentale" e alla "regione muscolare". Una serie di studi basati su aspetti morfogenetici della mandibola del topo (Bailey 1986; Atchley e Hall, 1991; Leamy 1993; Klingenberg *et al.*, 2001) hanno mostrato l'esistenza di settori distinti della mandibola, uno dominato dall'alveolo dell'incisivo (regione dentale) e uno dall'attacco di numerosi muscoli (regione muscolare) in base alla differente risposta in analisi basate sui caratteri genetici quantitativi (*quantitative trait loci* o QTL; Klingenberg *et al.*, 2001; Klingenberg e Leamy, 2001) e sull'asimmetria fluttuante (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2006). Le due regioni della mandibola sono, in alcuni casi, risultate soggette in misura differente ad influenze genetiche od ambientali.

All'evidenza di questi studi, è stato ritenuto opportuno condurre un'analisi sull'intero insieme di *landmark* ed analisi indipendenti sui *landmark* della regione muscolare e su quelli della regione dentale della mandibola. In questo modo è possibile verificare come la forma dei

due settori della mandibola sia influenzata da una componente di tipo cariologico od una di tipo ambientale.

2.8 - Correlazione fra variazione genetica e morfologica

Per verificare la correlazione fra variabilità genetica e morfologica sono state confrontate, tramite il *test* di Mantel, due matrici di distanza costruite a partire da distanze genetiche (*D*) e morfologiche (distanze di Procuste). Il *test* è stato applicato ad entrambe le aree di contatto tramite il programma NTSYSpc. Le popolazioni utilizzate nel *test* sono costituite da un sottocampione di individui per il quale sono disponibili sia dati genetici che morfologici.

Inoltre, la correlazione fra dati genetici e morfologici è stata visualizzata tramite il confronto di alberi di massima verosimiglianza costruiti a partire da dati genetici (frequenze alleliche delle popolazioni) e morfologici (*relative warp score matrix* ottenuta dai consensi delle stesse popolazioni).

Numero località	Località	Popolazione	Gruppo cromosomico	Coordinate geografiche
1	Collebaccaro (8)	CBA (8)	2n = 22	42°32'20" N 12°46'08" E
2	Le Mole (5)			
3	Le Mole-A (4)	MOL (16)	2n = 22	42°20'42" N 12°46'26" E
4	Le Mole-B (7)			
5	Monte Cavallo (4)			
6	San Pietro (7)	SPT (11)	Ibridi	42°18'46" N 12°46' 51" E
7	Colle del Gallo (6)			
8	San Benedetto (12)	SBE (18)	Ibridi	42°17'27" N 12°47' 41" E
9	Colle Paradiso (18)	CPA (18)	Ibridi	42°15'54" N 12°47'45" E
10	Salisano (6)	SAL (6)	Ibridi	42°15'28" N 12°44'34" E
11	Madonna del Mattone (25)	MDM (25)	Ibridi	42°15'03" N 12°45'07" E
12	Mompeo (8)			
13	Mompeo basso (7)	MMP (15)	Ibridi	42°14'49" N 12°46'37" E
14	Granica (11)			
15	Granica-Agriturismo (5)	GRA (16)	2n = 40	42°14'02" N 12°44'27" E
16	Montopoli Sabino A (4)			
17	Montopoli Sabino B (10)	MNT (14)	2n = 40	42°13'22" N 12°43'04" E

Tabella 2.2 - Area di ibridazione, analisi genetica. Località di cattura, raggruppamenti in popolazioni (utilizzate nelle analisi genetiche), gruppi cromosomici (utilizzati nell'analisi gerarchica AMOVA) e coordinate geografiche delle popolazioni (media delle coordinate geografiche delle località di cattura). Fra parentesi è indicato il numero di individui delle località di cattura e delle popolazioni.

Table 2.2 - Hybridization area, genetic analysis. Capture sites, population groupings (used in genetic analysis), chromosomal groups (used in AMOVA hierarchical analysis) and geographic coordinates (mean of the geographic coordinates capture sites). Sample size of the capture sites and of the populations are put in brackets.

Numero località	Località	Popolazione	Gruppo cromosomico	Coordinate geografiche
1	Collebaccaro (5)	CBA (5)	2n = 22	42°32'20" N 12°46'08" E
2	Le Mole (5)	MOL (11)	2n = 22	42°20'42" N 12°46'26" E
4	Le Mole-B (6)			
5	Monte Cavallo (3)	SPT (11)	Ibridi	42°18'46" N 12°46' 51" E
6	San Pietro (8)			
7	Colle del Gallo (6)	SBE (17)	Ibridi	42°17'27" N 12°47' 41" E
8	San Benedetto (11)			
9	Colle Paradiso (13)	CPA (13)	Ibridi	42°15'54" N 12°47'45" E
10	Salisano (6)	SAL (6)	Ibridi	42°15'28" N 12°44'34" E
11	Madonna del Mattone (18)	MDM (18)	Ibridi	42°15'03" N 12°45'07" E
12	Mompeo (6)	MMP (10)	Ibridi	42°14'49" N 12°46'37" E
13	Mompeo basso (4)			
14	Granica (10)	GRA (14)	2n = 40	42°14'02" N 12°44'27" E
15	Granica-Agriturismo (4)			
16	Montopoli Sabino A (6)	MNT (15)	2n = 40	42°13'22" N 12°43'04" E
17	Montopoli Sabino B (9)			

Tabella 2.3 - Area di ibridazione, analisi morfologica. Località di cattura, raggruppamenti in popolazioni (utilizzate nelle analisi morfologiche), gruppi cromosomici e coordinate geografiche delle popolazioni (media delle coordinate geografiche delle località di cattura). Fra parentesi è indicato il numero di individui delle località di cattura e delle popolazioni.

Table 2.3 - Hybridization area, morphologic analysis. Capture sites, population groupings (used in morphologic analysis), chromosomal groups (used in AMOVA hierarchical analysis) and geographic coordinates (mean of the geographic coordinates capture sites). Sample size of the capture sites and of the populations are put in brackets.

Numero località	Località	Popolazione	Gruppo cromosomico	Coordinate geografiche
3	Mopolino (2)	CAP (9)	2n = 24	42°31'05" N 13°18'04" E
4	Capitignano (7)			
5	Marana (4)	MAR (4)	2n = 24	42°29'35" N 13°12'18" E
6	Cascina (20)	CAS (20)	2n = 24	42°26'49" N 13°13'30" E
7	Barete (3)	PizACR (34)	2n = 24	42°26'09" N 13°17'49" E
8	Pizzoli 8 (8)			
9	Pizzoli 9 (10)			
10	Pizzoli 10 (9)			
11	Pizzoli 11 (4)			
12	Pizzoli 12 (2)	PizCD (15)	2n = 22	42°26'02" N 13°18'07" E
13	Pizzoli 13 (3)			
14	Pizzoli 14 (4)			
15	Villa S.Pietro (6)			
16	San Lorenzo (3)	SVT (3)	2n = 22	42°24'29" N 13°18'57" E
17	San Vittorino (3)			

Tabella 2.4 - Area di contatto, analisi genetica. Località di cattura, raggruppamenti in popolazioni (utilizzate nelle analisi genetiche), gruppi cromosomici (utilizzati nell'analisi gerarchica AMOVA) e coordinate geografiche delle popolazioni (media delle coordinate geografiche delle località di cattura). Fra parentesi è indicato il numero di individui delle località di cattura e delle popolazioni.

Table 2.4 - Contact area, genetic analysis. Capture sites, population groupings (used in genetic analysis), chromosomal groups (used in AMOVA hierarchical analysis) and geographic coordinates (mean of the geographic coordinates capture sites). Sample size of the capture sites and of the populations are put in brackets.

Numero località	Località	Popolazione	Gruppo cromosomico	Coordinate geografiche
3	Mopolino (2)	CAP (8)	2n = 24	42°31'05" N 13°18'04" E
4	Capitignano (6)			
1	San Paganico (1)	MAR (5)	2n = 24	42°29'35" N 13°12'18" E
2	Piedicolle (1)			
5	Marana (3)			
6	Cascina (18)	CAS (18)	2n = 24	42°26'49" N 13°13'30" E
7	Barete (3)	PizACR (31)	2n = 24	42°26'09" N 13°17'49" E
8	Pizzoli 8 (7)			
9	Pizzoli 9 (10)			
10	Pizzoli 10 (8)			
11	Pizzoli 11 (3)			
12	Pizzoli 12 (3)	PizCD (16)	2n = 22	42°26'02" N 13°18'07" E
13	Pizzoli 13 (2)			
14	Pizzoli 14 (3)			
15	Villa S.Pietro (5)			
16	San Lorenzo (3)			
17	San Vittorino (3)	SVT (3)	2n = 22	42°24'29" N 13°18'57" E

Tabella 2.5 - Area di contatto, analisi morfologica. Località di cattura, raggruppamenti in popolazioni (utilizzate nelle analisi morfologiche), gruppi cromosomici e coordinate geografiche delle popolazioni (media delle coordinate geografiche delle località di cattura). Fra parentesi è indicato il numero di individui delle località di cattura e delle popolazioni.

Table 2.5 - Contact area, morphologic analysis. Capture sites, population groupings (used in morphologic analysis), chromosomal groups (used in AMOVA hierarchical analysis) and geographic coordinates (mean of the geographic coordinates capture sites). Sample size of the capture sites and of the populations are put in brackets.

Numero località	Località	Popolazione	Gruppo cromosomico	Coordinate geografiche
-	Anzio (9)	ANZ (9)	2n = 40	41°29'10" N 12°37'7" E

Tabella 2.6 - Popolazione lontana dalle aree di contatto utilizzata nelle analisi morfologiche. Fra parentesi è indicato il numero di individui.

Table 2.6 - Distant population from the contact areas used in morphologic analysis. Sample size of the capture sites and populations are put in brackets.

3 - RISULTATI

3.1 - Indagine citogenetica

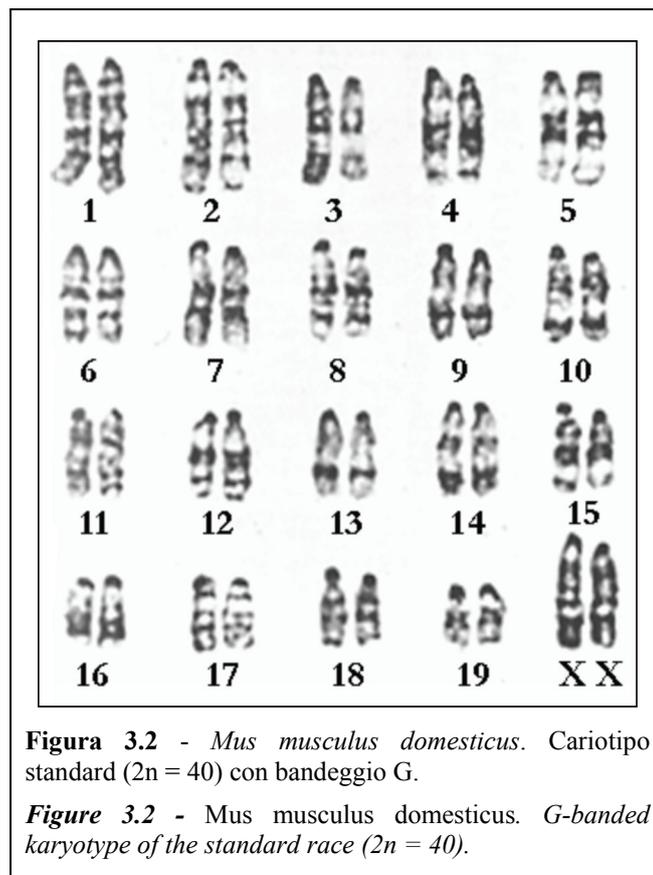
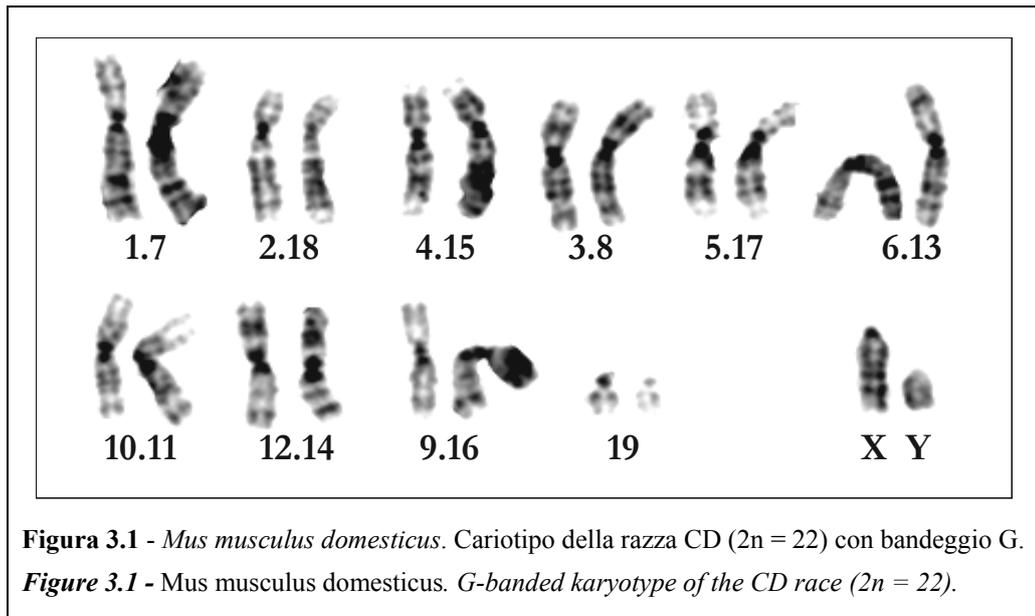
La caratterizzazione citogenetica del campione è stata eseguita sui 75 esemplari catturati negli ultimi tre anni (indicati con la sigla SBP e ANZ in appendice A e B). Gli individui raccolti nei trappolamenti precedenti (indicati con la sigla SB, AT e LAG in appendice A e B) sono stati sottoposti agli esami citogenetici nel periodo di cattura (1996-2000).

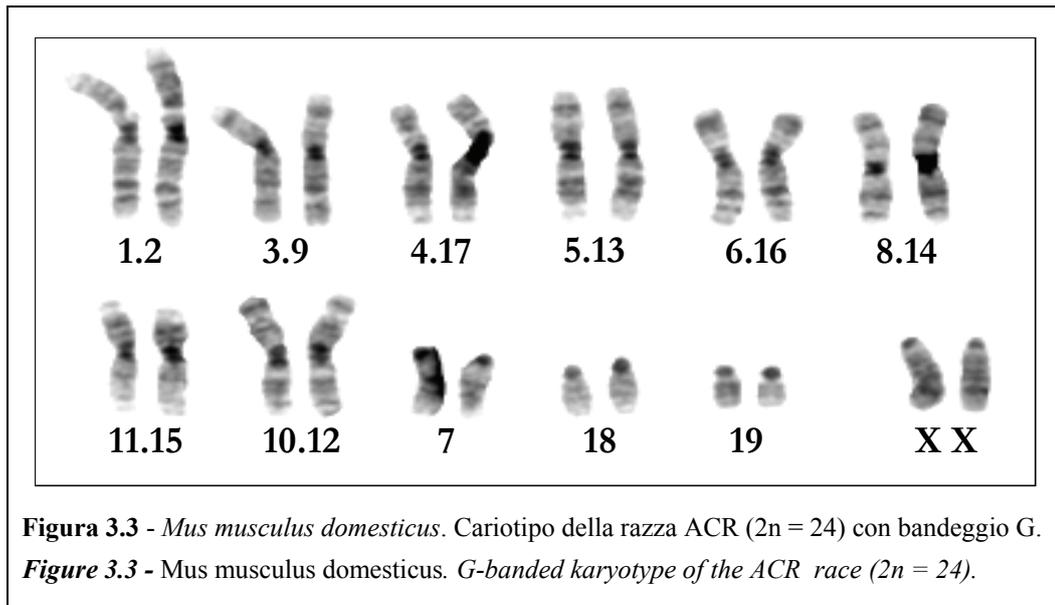
L'analisi citogenetica ha confermato la stabilità dell'area di ibridazione; esemplari campionati all'interno dell'area, infatti, sono risultati anch'essi ibridi con numero diploide conforme al gradiente cromosomico osservato da Spirito *et al.*, (1980) e successivamente da Castiglia e Capanna (1999a). Il campionamento in aree limitrofe alle due estremità della fascia di ibridazione ha permesso di catturare individui rappresentanti di quattro nuove popolazioni rispetto a quelle dei lavori precedenti di cui due sono con cariotipo standard (GRA, tranne un esemplare ibrido, e MNT), una con cariotipo standard ed ibrido (MMP) ed una con cariotipo CD, a 22 cromosomi (CBA). MMP presenta 4 topi con cromosomi robertsoniani ($2n = 35, 37, 38$ e 39) e in località Granica (GRA) 1 dei 16 esemplari catturati presenta 39 cromosomi per la presenza di un metacentrico. Inoltre, sono stati effettuati trappolamenti mirati ad aumentare il numero di individui delle precedenti località di cattura.

Per quanto riguarda l'area di contatto, non sono stati effettuati ulteriori campionamenti e le analisi genetiche e morfologiche sono state condotte sugli individui catturati e caratterizzati citogeneticamente negli anni 1996 - 2000.

In appendice A e B sono riportati il numero diploide di ciascun individuo, la località di cattura e la popolazione di appartenenza.

Le tre figure successive (3.1, 3.2 e 3.3) mostrano i cariotipi con bandeggio G tipici delle tre razze parentali in esame (CD $2n = 22$, Standard $2n = 40$ e ACR $2n = 24$).

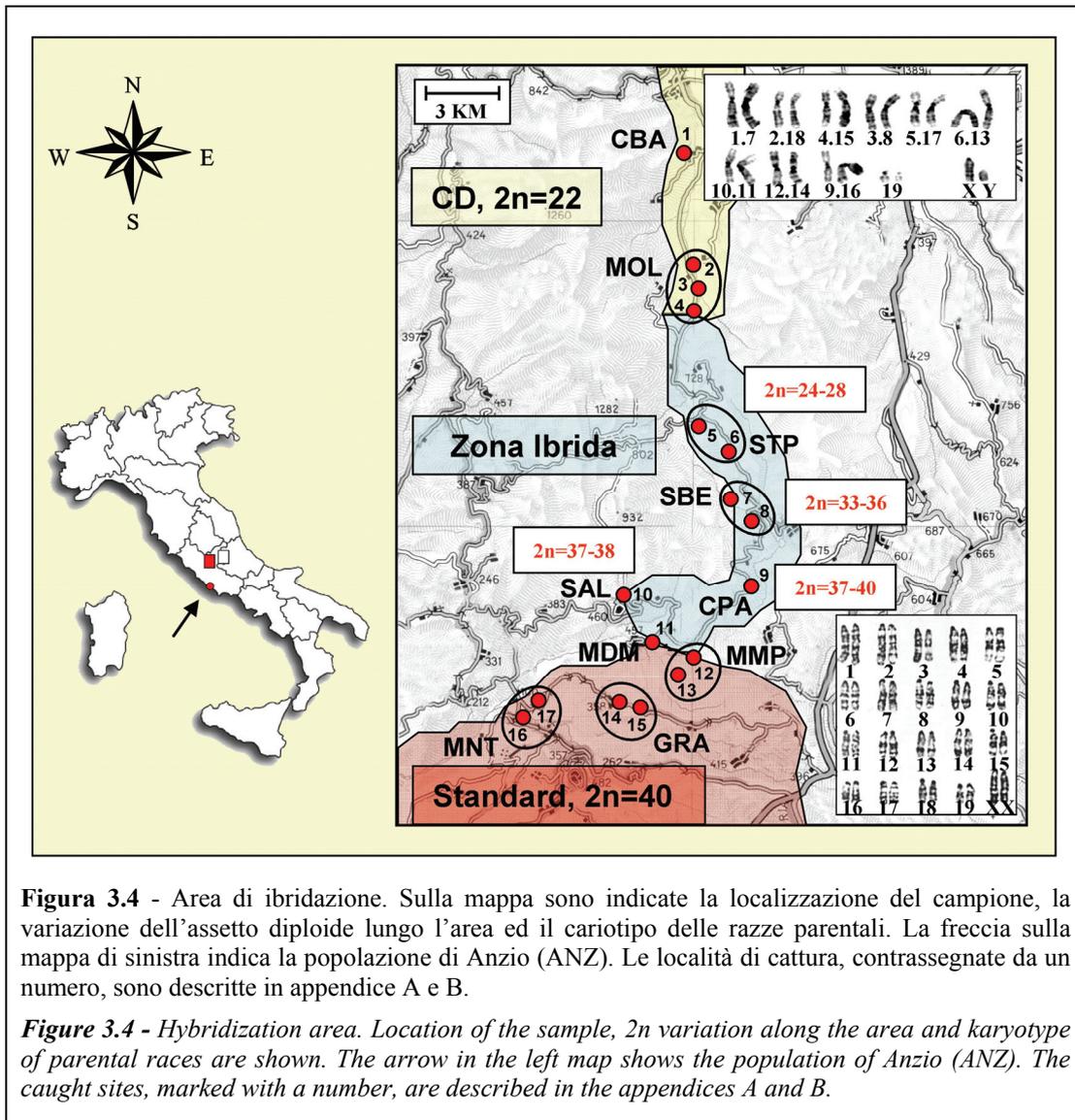




3.2 - Analisi genetica: i loci microsatelliti

3.2.1 - Area di ibridazione: CD-Standard

L'analisi genetica inerente l'area di ibridazione è stata effettuata sulle 10 popolazioni geografiche evidenziate in figura 3.4 e descritte in tabella 2.2. E' stata eseguita una serie di analisi sulla totalità dei loci a disposizione ed una sui singoli loci e su due diversi insiemi di dati costituiti rispettivamente dai loci telomerici e da quelli pericentromerici. In questo modo è stato possibile caratterizzare geneticamente le popolazioni, verificare la struttura genetica delle popolazioni attraverso l'area in esame (e quindi valutare la funzione della zona di ibridazione come barriera allo scambio di geni) ed analizzare la dipendenza del flusso genico dalla posizione dei loci microsatelliti (pericentromerica vs peritelomerica) sul braccio cromosomico.



3.2.1.1 - Caratterizzazione genetica delle popolazioni

Le analisi genetiche sono state eseguite su 12 loci microsatelliti (tabella 2.1). Utilizzando i relativi *primer* sono stati genotipizzati un totale di 147 individui appartenenti alle 10 popolazioni mostrate in tabella 2.2. Inizialmente sono stati selezionati 15 *primer*, 3 dei quali sono stati scartati. Due di questi, infatti, sono risultati monomorfici (D5Mit147 e D10Mit145) ed uno (D12Mit246) ha presentato numerose bande aspecifiche.

Nella tabella 3.1 sono riportati, per ogni popolazione, il numero di alleli, le frequenze alleliche, l'eterozigosi attesa e osservata, gli alleli esclusivi ed il numero medio di alleli. Il

locus con il maggior numero di forme alleliche risulta essere il D11Mit61 (18 alleli), mentre quello con un minor grado di poliformismo è il D6Mit26 (6 alleli). Il numero medio di alleli varia da 4.42 per la popolazione di dimensioni più ridotte, CBA, a 8.08 per la popolazione GRA. Il numero di alleli esclusivi varia da 0 per le popolazioni MMP e SAL a 4 per la popolazione SPT. Escludendo il cromosoma 19, i loci pericentromerici presentano 11 alleli esclusivi ripartiti fra tutte le popolazioni, contro i 5 dei loci telomerici. I livelli di eterozigosità osservata variano da 0.531 per MOL a 0.720 per MNT. Non è stata riscontrata differenza fra i valori di eterozigosità fra le popolazioni con cariotipo parentale (H_0 media = 0.661) e quelle ibride (H_0 media = 0.663).

L'analisi della distribuzione delle frequenze alleliche lungo l'area di ibridazione ha mostrato degli andamenti clinali solo per alcuni alleli dei loci pericentromerici (evidenziati con un tratto più marcato in figura 3.5). Gli alleli dei loci telomerici, invece, hanno una distribuzione più omogenea nelle dieci popolazioni di studio rispetto a questi ultimi. L'unico locus pericentromerico senza alcuna evidenza di andamento clinale degli alleli che lo caratterizzano è il D19Mit94, mappato sul cromosoma 19, l'unico autosoma che, in quest'area, non partecipa mai alla fusione robertsoniana. Questo modello indica che, lungo l'area di ibridazione, il flusso genico è ostacolato da una barriera dovuta in gran parte alla difficoltà di "movimento" del materiale genetico localizzato in prossimità del centromero.

L'andamento allelico lungo l'area di ibridazione è mostrato, per ogni singolo locus, in figura 3.5.

Tabella 3.1 - Frequenze alleliche, eterozigosi attesa (H_e), osservata (H_o) e numero di alleli (n) per i 12 loci per ogni popolazione. La dimensione del campione è indicata fra parentesi. Gli alleli esclusivi e la frequenza corrispondente è indicata in grassetto. L'eterozigosi osservata ($H_{o-overall}$) e attesa ($H_{e-overall}$) per le 10 popolazioni calcolate su tutti i loci, il numero di alleli esclusivi (NPA), la proporzione di alleli esclusivi per locus, (PPA) e il numero medio di alleli per locus (MNA) per ogni popolazione sono indicati in fondo alla tabella 3.1.

Table 3.1 - Allele frequencies observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, number of alleles (n) for the 12 microsatellite loci for each population. Sample size is put in brackets. Private alleles and their corresponding frequencies are in bold. Observed ($H_{o-overall}$) and expected ($H_{e-overall}$) heterozygosities for the 10 populations calculated over all loci, total number of private alleles (NPA), proportion of private alleles per locus (PPA) and mean number of alleles per locus (MNA) for each population are given at the bottom of table 3.1.

Locus	Allele	Popolazione*										
		CBA (8)	MOL (16)	SPT (11)	SBE (18)	CPA (18)	SAL (6)	MDM (25)	MMP (15)	GRA (16)	MNT (14)	
D6Mit138	111	-	0.0313	-	-	-	-	-	-	-	-	
	113	0.6250	0.2500	-	-	-	-	-	-	-	-	
	115	-	0.0313	-	-	-	-	-	0.4667	-	-	
	117	0.3125	-	-	-	0.0278	-	-	-	-	-	
	119	-	-	0.0909	-	-	-	-	-	-	-	
	121	0.0625	0.2500	0.1364	0.2500	0.2500	0.3333	0.3200	-	0.2188	-	
	123	-	0.1250	0.1364	0.1667	0.3056	-	0.0200	0.5333	0.0625	0.2857	
	125	-	0.1875	0.2727	0.2222	0.3056	0.5000	-	-	0.1250	-	
	127	-	0.0625	-	-	0.0556	-	-	-	0.0313	0.4643	
	129	-	0.0313	0.3182	0.0278	0.0556	0.0833	0.6400	-	0.3125	-	
	131	-	-	-	0.1944	-	-	0.0200	-	0.0938	0.2500	
	133	-	0.0313	0.0455	-	-	-	-	-	0.0625	-	
	135	-	-	-	0.0278	-	0.0833	-	-	0.0938	-	
	137	-	-	-	0.1111	-	-	-	-	-	-	
H_e		0.5417	0.8427	0.8139	0.8317	0.7651	0.6818	0.4971	0.5149	0.8387	0.6640	
H_o		0.7500	0.5000	0.5455	0.6111	0.5000	0.3333	0.4400	0.6667	0.7500	0.7143	
n		4	9	7	8	7	5	5	3	9	4	
D6Mit26	182	-	-	-	-	-	-	0.2600	0.1000	0.0313	0.1786	
	184	-	0.0625	-	-	-	-	0.0400	-	0.0313	-	
	186	0.0625	-	-	-	-	-	-	-	0.0313	0.0714	
	188	0.1250	0.1875	0.2727	0.0278	0.0556	-	0.2600	0.2667	0.0625	0.1071	
	190	0.3125	0.1875	-	0.3333	0.1944	0.4167	0.1800	0.2000	0.3750	0.2143	
	192	0.3125	0.2500	0.5000	0.5000	0.5556	0.0833	0.1600	0.1000	0.3125	0.2857	
	194	0.1250	0.1563	0.0909	-	0.1111	0.2500	0.1000	0.2333	0.0625	-	
	196	0.0625	0.1250	0.1364	0.0556	0.0833	0.2500	-	0.1000	0.0938	0.1429	
	198	-	0.0313	-	0.0833	-	-	-	-	-	-	
	H_e		0.8167	0.8488	0.6797	0.6460	0.6492	0.7576	0.8114	0.8322	0.7661	0.8333
H_o		0.6250	0.6875	0.7273	0.5000	0.6111	0.8333	0.6000	0.7333	0.5000	0.7143	
n		6	7	4	5	5	4	6	6	8	6	
D9Mit251	129	-	-	-	0.0556	-	-	0.0600	-	0.2813	0.3929	
	131	0.4375	0.5313	0.1818	0.2778	0.1944	0.2500	-	-	-	0.0714	
	133	-	-	0.5000	0.0556	0.6389	0.4167	0.0200	0.3333	0.2500	0.2500	
	135	0.3750	0.3750	0.2273	0.2500	0.0833	-	-	-	0.2188	0.0714	
	137	-	-	0.0909	0.2222	-	-	0.0200	0.2667	0.0625	-	
	139	0.1875	0.0938	-	0.1389	-	-	-	0.2333	-	-	
	145	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0625	0.1786	
	147	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1250	-	
	151	-	-	-	-	-	-	0.0400	-	-	-	
	159	-	-	-	-	0.0833	0.3333	0.3200	0.1000	-	0.0357	
	161	-	-	-	-	-	-	0.5400	0.0667	-	-	
	H_e		0.6750	0.5867	0.6883	0.8079	0.5556	0.7121	0.6122	0.7747	0.8125	0.7672
	H_o		0.7500	0.3750	0.7273	0.6667	0.3333	0.5000	0.7200	0.6667	0.6250	0.5714
n		3	3	4	6	4	3	6	5	6	6	

		Popolazione*									
Locus	Allele	CBA (8)	MOL (16)	SPT (11)	SBE (18)	CPA (18)	SAL (6)	MDM (25)	MMP (15)	GRA (16)	MNT (14)
D9Mit52	160	0.1250	0.0625	0.0455	0.0556	0.0833	0.1667	0.0800	0.5000	0.0938	0.1786
	166	0.1250	-	-	0.0556	-	-	-	-	0.0938	0.0357
	170	0.2500	0.0313	-	-	0.0278	-	-	-	-	-
	172	-	0.0313	-	0.0278	0.0833	-	-	0.2333	0.2500	-
	174	0.1875	0.1875	0.0909	0.0833	0.0556	-	0.0800	-	0.0938	0.2143
	176	-	0.3125	0.1364	0.1944	0.0278	0.2500	0.5200	-	0.0625	0.0714
	178	-	-	-	-	0.2778	0.0833	0.1000	-	0.2813	0.1786
	180	0.1250	0.1875	0.3182	0.3333	0.3611	0.1667	0.2200	0.2667	0.0313	0.0714
	182	0.1875	0.1875	0.4091	0.1944	0.0833	0.3333	-	-	-	0.2143
	184	-	-	-	0.0556	-	-	-	-	0.0938	0.0357
H _e		0.8750	0.8165	0.7359	0.8190	0.7889	0.8333	0.6718	0.6460	0.8448	0.8624
H _o		0.8750	0.6875	0.8182	0.7222	0.6667	1.0000	0.4800	0.6667	0.7500	0.9286
n		6	7	5	8	8	5	5	3	8	8
D10Mit75	140	-	0.0313	0.0909	0.1389	-	0.0833	0.4400	0.2000	0.0313	-
	142	-	-	0.0909	-	0.2778	0.1667	0.0600	0.1667	0.1563	0.1786
	144	-	0.0313	-	0.0833	0.0833	0.5000	0.3000	-	0.0938	-
	146	-	0.1250	0.1364	0.1111	-	-	-	0.0667	-	0.2500
	148	-	0.0625	0.1364	0.2778	0.4167	0.0833	-	-	-	-
	150	0.1875	0.0313	0.0455	0.0278	0.0833	-	0.1400	0.2667	0.1250	0.4643
	152	-	0.1875	0.4091	0.1944	0.1111	0.0833	-	0.2000	0.4375	-
	154	0.8125	0.1563	0.0455	0.1667	-	0.0833	0.0400	0.1000	0.1563	-
	156	-	0.3750	0.0455	-	-	-	0.0200	-	-	0.1071
	158	-	-	-	-	0.0278	-	-	-	-	-
H _e		0.3250	0.8024	0.8095	0.8413	0.7429	0.7576	0.7053	0.8345	0.7581	0.7037
H _o		0.3750	0.5625	0.9091	0.7222	0.7778	0.6667	0.5600	0.5333	0.6250	0.6429
n		2	8	8	7	6	6	6	6	6	4
D10Mit103	141	-	-	0.0909	0.0556	0.0833	0.1667	0.1200	0.1333	0.0625	0.2143
	143	-	0.2188	-	0.0833	0.0833	-	0.1400	0.1000	0.0313	0.3214
	145	-	-	-	0.1111	0.0833	-	0.0200	0.1000	-	-
	147	0.1250	0.0625	0.0455	0.2500	0.0833	-	0.0200	0.1000	0.0313	-
	149	0.0625	0.2813	0.1818	0.0556	0.2222	-	0.1600	0.1000	0.2188	-
	151	0.3125	0.1250	0.0909	0.0556	0.0833	0.4167	-	-	-	-
	153	-	-	-	-	-	-	0.0200	0.0667	0.0938	0.1786
	155	0.1875	0.1563	0.3636	0.3056	0.2500	0.2500	0.1400	0.0667	0.2500	-
	157	-	-	-	-	-	-	0.2400	0.2333	0.0625	-
	159	0.3125	0.0938	0.1818	-	-	0.1667	0.1400	0.0333	0.0938	0.2500
161	-	0.0313	0.0455	0.0833	0.1111	-	-	0.0667	0.1563	0.0357	
169	-	0.0313	-	-	-	-	-	-	-	-	
H _e		0.8000	0.8448	0.8182	0.8317	0.8651	0.7727	0.8596	0.9034	0.8649	0.7831
H _o		0.8750	0.7500	0.8182	0.8333	0.5556	0.5000	0.8000	0.8000	0.6875	0.6429
n		5	8	7	8	8	4	9	10	9	5

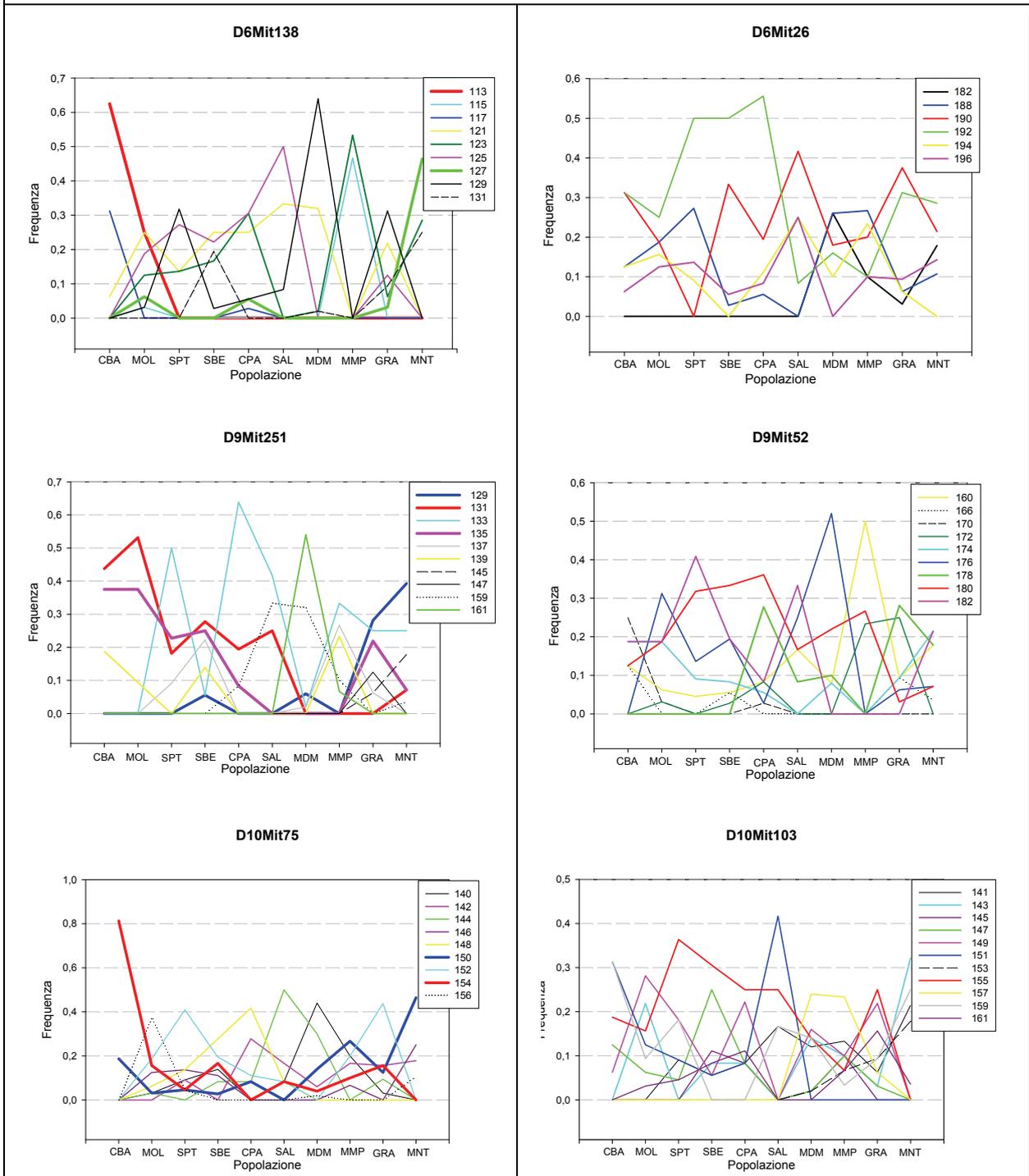
Locus	Allele	Popolazione*									
		CBA (8)	MOL (16)	SPT (11)	SBE (18)	CPA (18)	SAL (6)	MDM (25)	MMP (15)	GRA (16)	MNT (14)
D11Mit74	213	-	-	-	-	0.4167	-	0.6200	-	-	-
	215	-	-	-	-	-	-	0.0200	-	0.0625	0.0714
	217	0.2500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	219	-	-	0.0909	-	-	-	-	-	-	-
	221	0.0625	-	0.1818	0.3889	0.3611	0.4167	0.2000	-	0.1250	-
	223	0.0625	-	-	0.0556	0.0556	0.2500	-	-	0.2813	0.2143
	225	0.1875	0.2500	0.0455	0.0833	0.0833	0.1667	0.1400	0.1000	0.1875	0.1786
	227	0.1875	0.2188	0.5455	0.2222	0.0278	-	-	0.1000	0.0625	0.1786
	229	0.1250	0.5000	0.1364	0.1111	0.0556	-	0.0200	0.7667	0.0625	0.1071
	231	0.1250	-	-	0.1389	-	-	-	0.0333	0.1250	0.0714
	233	-	0.0313	-	-	-	-	-	-	-	0.0714
	235	-	-	-	-	-	0.1667	-	-	-	0.1071
	237	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0625	-
	239	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0313	-
H _e		0.8833	0.6593	0.6710	0.7794	0.7016	0.7727	0.5665	0.4046	0.8649	0.8836
H _o		0.8750	0.3750	0.8182	0.6111	0.5000	0.5000	0.6000	0.2667	0.8125	0.7143
n		7	4	5	6	6	4	5	4	9	8
D11Mit61	134	-	-	-	0.0278	-	-	-	-	0.1250	-
	136	-	-	-	0.0278	-	0.0833	0.0600	-	0.0313	-
	138	-	0.0313	-	0.1944	0.1389	-	0.0200	-	0.0313	0.2143
	140	-	0.0313	0.0909	0.1111	0.0556	-	-	0.0667	0.0313	0.0714
	142	-	-	-	0.0278	0.0278	-	0.0200	-	0.0625	0.0714
	144	-	-	-	-	0.0833	-	0.1400	-	-	-
	146	-	-	-	-	0.0556	0.2500	0.1200	0.4333	0.0938	0.0714
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0357
	154	-	0.0625	-	-	-	-	0.1200	-	-	-
	156	-	0.0625	-	-	-	0.0833	0.0600	0.4333	-	0.0357
	158	-	0.2188	0.1364	0.0278	0.0278	0.1667	0.2200	-	0.3438	-
	160	0.0625	0.2500	0.1364	0.2500	0.0833	0.1667	0.1000	0.0667	0.0625	0.1071
	162	-	0.0938	0.2727	0.1389	0.0556	0.1667	0.0600	-	0.0313	0.1071
	166	0.6875	0.1563	0.1818	0.1111	0.3056	0.0833	0.0800	-	0.1250	0.2500
	168	0.0625	0.0625	0.0909	0.0833	0.1389	-	-	-	0.0625	0.0357
	170	-	-	0.0455	-	0.0278	-	-	-	-	-
	184	0.1875	0.0313	-	-	-	-	-	-	-	-
194	-	-	0.0455	-	-	-	-	-	-	-	
H _e		0.5167	0.8690	0.8745	0.8698	0.8667	0.9091	0.8931	0.6368	0.8528	0.8810
H _o		0.5000	0.6250	0.8182	0.7778	0.7222	1.0000	0.6800	0.6000	0.6875	0.9286
n		4	10	8	10	11	7	11	4	11	10
D12Mit182	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0357
	132	-	-	-	0.0833	0.1389	0.3333	0.4800	0.4667	-	-
	134	0.1875	0.0938	0.1364	0.3611	0.0833	0.0833	0.0200	-	0.1875	0.2857
	136	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0938	0.0357
	138	-	0.0313	-	-	0.1944	0.1667	-	-	0.0313	0.1786
	140	0.6875	0.7813	0.1818	0.4444	0.3889	0.2500	0.5000	-	0.3125	0.3214
	142	0.1250	0.0938	0.0455	-	0.0833	0.1667	-	-	0.2500	0.0357
	144	-	-	0.5455	0.1111	0.0556	-	-	-	0.0625	0.0357
	146	-	-	-	-	0.0556	-	-	-	-	-
	148	-	-	-	-	-	-	-	0.5333	0.0625	-
	152	-	-	0.0909	-	-	-	-	-	-	0.0357
	154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0357
	H _e		0.5083	0.3831	0.6710	0.6714	0.7937	0.8333	0.5298	0.5149	0.8125
H _o		0.6250	0.2500	0.5455	0.5556	0.6667	0.8333	0.5200	0.6667	0.6875	0.7857
n		3	4	5	4	7	5	3	2	7	9

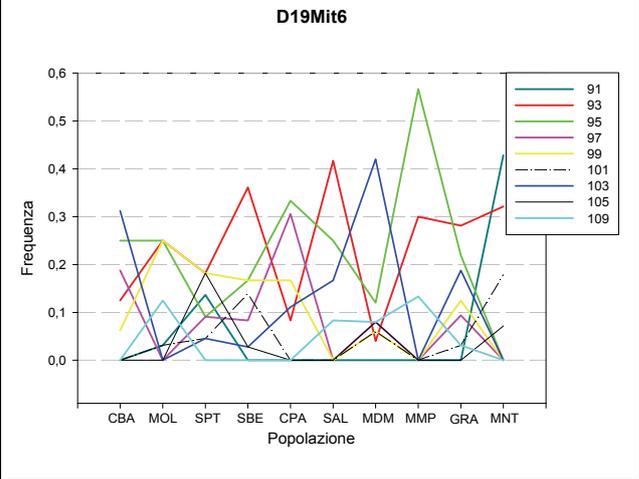
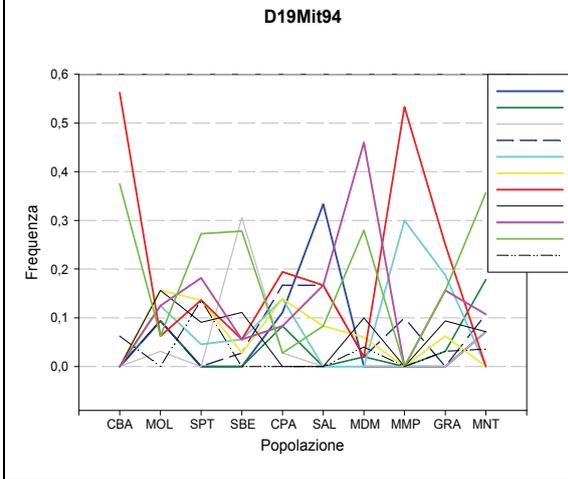
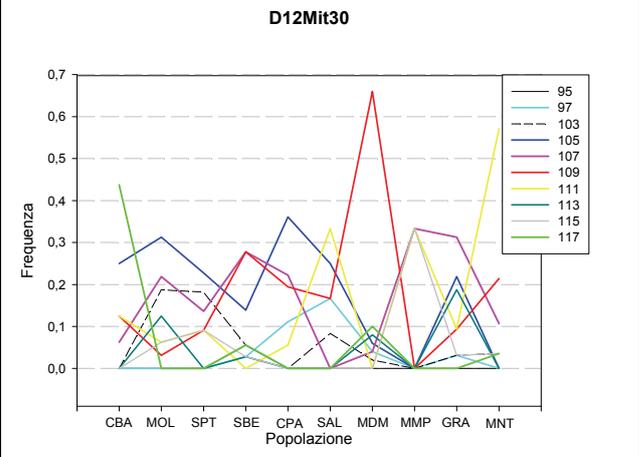
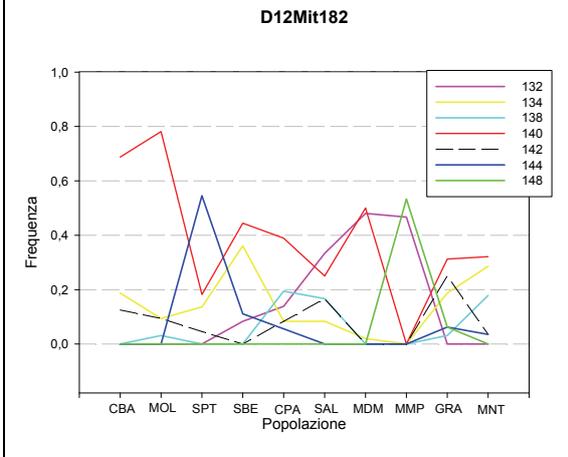
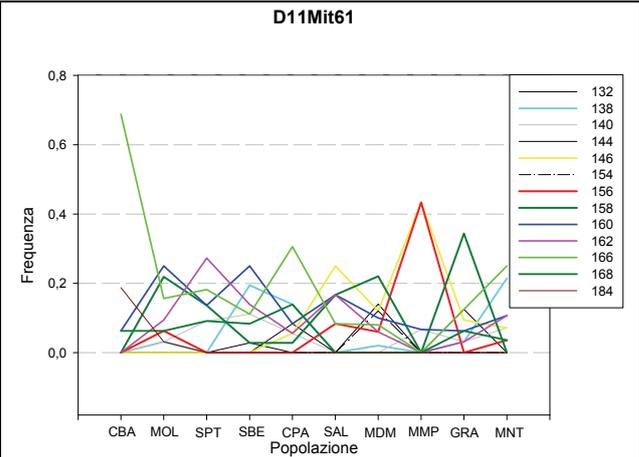
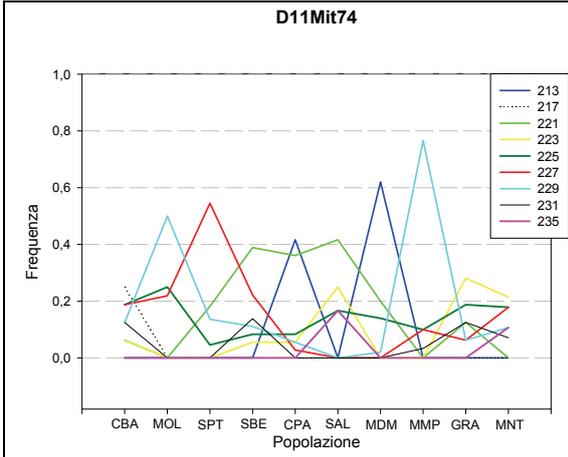
Locus	Allele	Popolazione*										
		CBA (8)	MOL (16)	SPT (11)	SBE (18)	CPA (18)	SAL (6)	MDM (25)	MMP (15)	GRA (16)	MNT (14)	
D12Mit30	89	-	-	-	-	0.0278	-	-	-	-	-	
	91	-	-	0.0909	-	-	-	-	-	-	-	
	95	-	-	-	0.0556	-	-	-	-	-	-	
	97	-	-	-	0.0278	0.1111	0.1667	0.0400	-	0.0313	-	
	99	-	-	-	0.0278	0.0278	-	-	-	-	-	
	101	-	-	0.0909	0.0278	-	-	-	-	-	-	
	103	-	0.1875	0.1818	0.0556	-	0.0833	0.0200	-	0.0313	0.0357	
	105	0.2500	0.3125	0.2273	0.1389	0.3611	0.2500	0.0600	-	0.2188	-	
	107	0.0625	0.2188	0.1364	0.2778	0.2222	-	0.0400	0.3333	0.3125	0.1071	
	109	0.1250	0.0313	0.0909	0.2778	0.1944	0.1667	0.6600	-	0.0938	0.2143	
	111	0.1250	0.0625	0.0909	-	0.0556	0.3333	-	0.3333	0.0938	0.5714	
	113	-	0.1250	-	0.0278	-	-	0.0800	-	0.1875	-	
	115	-	0.0625	0.0909	0.0278	-	-	-	0.3333	0.0313	0.0357	
	117	0.4375	-	-	0.0556	-	-	0.1000	-	-	0.0357	
H _e		0.7583	0.8206	0.8961	0.8365	0.7873	0.8333	0.5518	0.6897	0.8246	0.6349	
H _o		0.5000	0.5625	0.7273	0.7222	0.6667	0.5000	0.4800	0.9333	0.8750	0.5000	
n		5	7	8	11	7	5	7	3	8	6	
D19Mit94	89	-	0.0938	-	-	0.1111	0.3333	-	-	-	0.0714	
	91	-	0.0938	-	-	0.0833	-	0.0200	-	0.0313	0.1786	
	93	-	0.0313	-	0.3056	0.0278	-	-	-	-	0.0714	
	95	-	0.0938	-	0.0278	0.1667	0.1667	0.0200	0.1000	-	0.1071	
	97	-	0.1250	0.0455	0.0556	0.1389	-	-	0.3000	0.1875	-	
	99	-	0.1563	0.1364	0.0278	0.1389	0.0833	0.0600	-	0.0625	-	
	101	0.5625	0.0625	0.1364	0.0556	0.1944	0.1667	0.0200	0.5333	0.2500	-	
	103	-	0.1563	0.0909	0.1111	-	-	0.1000	-	0.0938	0.0714	
	105	-	0.1250	0.1818	0.0556	0.0833	0.1667	0.4600	-	0.1563	0.1071	
	107	0.3750	0.0625	0.2727	0.2778	0.0278	0.0833	0.2800	-	0.1563	0.3571	
	109	0.0625	-	0.1364	-	-	-	0.0400	-	0.0313	0.0357	
	111	-	-	-	0.0833	0.0278	-	-	0.0667	0.0313	-	
	H _e		0.5750	0.9133	0.8658	0.8222	0.8921	0.8636	0.7078	0.6322	0.8649	0.8307
	H _o		0.5000	0.5000	0.6364	0.7222	0.7778	0.6667	0.6000	0.8667	0.6875	0.8571
n		3	10	7	9	11	6	8	4	9	8	
D19Mit6	91	-	0.0313	0.1364	-	-	-	-	-	-	0.4286	
	93	0.1250	0.2500	0.1818	0.3611	0.0833	0.4167	0.0400	0.3000	0.2813	0.3214	
	95	0.2500	0.2500	0.0909	0.1667	0.3333	0.2500	0.1200	0.5667	0.2188	-	
	97	0.1875	-	0.0909	0.0833	0.3056	-	0.0800	-	0.0938	-	
	99	0.0625	0.2500	0.1818	0.1667	0.1667	-	0.0600	-	0.1250	-	
	101	-	0.0313	0.0455	0.1389	-	-	0.0600	-	0.0313	0.1786	
	103	0.3125	-	0.0455	0.0278	0.1111	0.1667	0.4200	-	0.1875	-	
	105	-	-	0.1818	0.0278	-	-	0.0800	-	-	0.0714	
	107	-	-	-	0.0278	-	-	-	-	-	-	
	109	-	0.1250	-	-	-	0.0833	0.0800	0.1333	0.0313	-	
	111	0.0625	0.0313	0.0455	-	-	0.0833	0.0600	-	0.0313	-	
	113	-	0.0313	-	-	-	-	-	-	-	-	
	H _e		0.8333	0.8185	0.9004	0.8079	0.7698	0.7879	0.7935	0.5908	0.8367	0.7011
	H _o		1.0000	0.5000	0.5455	0.6111	0.8889	1.0000	0.5200	0.6667	0.6250	0.6429
n		6	8	9	8	5	5	9	3	8	4	
H _e -overall		0.6757	0.7671	0.7854	0.7971	0.7648	0.7929	0.6833	0.6646	0.8285	0.7791	
H _o -overall		0.6875	0.5313	0.7197	0.6713	0.6389	0.6944	0.5833	0.6722	0.6927	0.7202	
NPA		1	3	4	2	2	0	1	0	3	2	
PPA		0.08	0.25	0.33	0.16	0.16	0.00	0.08	0.00	0.25	0.16	
MNA		4.42	7.08	6.33	7.42	6.92	4.83	6.58	4.33	8.08	6.42	

* Vedi tabella 2.2 per le abbreviazioni delle popolazioni.

Figura 3.5 - Variazione della frequenza allelica lungo l'area di ibridazione. Ogni linea colorata rappresenta la frequenza (asse delle ordinate) di un singolo allele in ogni popolazione (asse delle ascisse) lungo il transetto di studio CD-Standard. Ogni grafico rappresenta un locus, i relativi alleli sono descritti nella legenda in alto a destra. I grafici nella parte sinistra della pagina indicano l'andamento allelico dei loci pericentromerici, quelli a destra dei loci telomerici. Sono stati esclusi dalle rappresentazioni gli alleli con una frequenza inferiore a 0.1 in tutte le popolazioni. Gli alleli con andamento clinale sono evidenziati con un tratto più marcato rispetto agli altri.

Figure 3.5 - Allele frequencies variation along the hybridization area. Each tinted line shows a single allele frequency (ordinates axis) in each population (abscissa axis) along the study transept CD-Standard. Each graph shows a locus and the corresponding alleles are given in the upper right legend. The graphs in the left side of the page show the allele trend of the pericentromeric loci, the graphs in the right side of the page show the allele trend of the telomeric loci. The alleles with a frequency lower than 0.1 in all populations were excluded from the representations. The alleles with a clinal trend are highlighted with a more pronounced line than the others.





3.2.1.2 - Equilibrio di Hardy-Weinberg e *linkage disequilibrium*

Nella tabella 3.2 vengono riportati i risultati del *p-test* per l'equilibrio di Hardy-Weinberg (H-W) eseguito in ciascuna popolazione per ognuno dei 12 loci. Come si osserva dai valori in grassetto, solo le popolazioni CBA, SPT e SAL sono in equilibrio di H-W per tutti i loci, mentre le altre 7 popolazioni deviano significativamente da tale equilibrio per almeno un locus. Nessuno dei loci presenta deviazioni significative in più della metà delle popolazioni (solo il locus D10Mit74 devia da H-W in 5 popolazioni). Questo dato ha permesso l'utilizzo di tutti i loci per le successive analisi sul differenziamento delle popolazioni. Delle 19 combinazioni popolazione/locus che non sono in equilibrio di H-W, solamente 4 presentano un eccesso di eterozigoti rispetto ai valori attesi, le restanti 15 presentano, invece, un deficit di eterozigoti.

L'analisi dell'indipendenza dei loci, valutata tramite il *test* esatto di Fischer, ha mostrato l'assenza di *linkage* fra tutte le possibili coppie di loci in ogni popolazione. Questo dato, mostrato dai valori in tabella 3.2 ($p > 0.00007$ in tutte le combinazioni calcolabili; soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni), è in accordo con la mappatura dei loci. Infatti, i 12 loci selezionati si trovano su 6 cromosomi diversi dell'assetto standard e i 2 loci dello stesso cromosoma sono localizzati in posizione telomerica e pericentromerica.

Locus	Popolazione									
	CBA	MOL	SPT	SBE	CPA	SAL	MDM	MMP	GRA	MNT
D6Mit138	0.1173	0.0013	0.0978	0.0563	0.0000	0.3208	0.0000	0.0016	0.0214	0.0383
D6Mit26	0.6981	0.0345	0.0766	0.0013	0.0011	0.9170	0.0009	0.0559	0.0700	0.0156
D9Mit251	0.5395	0.0005	0.0238	0.0008	0.0006	0.7652	0.0002	0.0036	0.1862	0.3931
D9Mit52	0.3590	0.0278	0.0973	0.3077	0.0040	0.8340	0.0005	0.0104	0.1392	0.0047
D10Mit75	0.0626	0.0014	0.9784	0.1198	0.0000	0.7098	0.0006	0.0008	0.0073	0.0763
D10Mit103	0.5839	0.1020	0.1809	0.0582	0.1685	0.3355	0.0017	0.7737	0.0308	0.0099
D11Mit74	0.1365	0.0000	0.0732	0.0001	0.0006	0.5884	0.0001	0.0000	0.0430	0.0000
D11Mit61	0.0256	0.0056	0.7288	0.0001	0.0360	1.0000	0.0192	0.0052	0.0241	0.0120
D12Mit182	0.0969	0.0001	0.2334	0.0222	0.0150	1.0000	0.0000	0.0016	0.0000	0.0323
D12Mit30	0.5022	0.1574	0.0151	0.0741	0.0554	1.0000	0.0000	0.0077	0.0279	0.0003
D19Mit94	0.0744	0.0945	0.1233	0.0247	0.0000	1.0000	0.0001	0.0005	0.0946	0.3643
D19Mit6	0.2248	0.0054	0.0426	0.0020	0.0044	0.5968	0.0000	0.0000	0.0217	0.0017

Tabella 3.2 - Valori di *p* del *test* per l'equilibrio di Hardy-Weinberg eseguito in ciascuna popolazione per ogni locus. In grassetto sono evidenziati valori che indicano deviazioni significative da H-W ($p < 0.0004$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.2 - Hardy-Weinberg equilibrium: *p*-values of the test executed in each population for each locus. The values that indicate significance deviations from H-W ($p < 0.0004$, corrected threshold through the Bonferroni procedure) are shown in bold.

Tabella 3.3 - Valori di p per il *test* sul *linkage disequilibrium* calcolato per ogni coppia di loci per ogni popolazione; $p > 0.00007$ (soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni) indica assenza di *linkage* fra i loci in esame. Le caselle prive del valore di p indicano impossibilità di calcolo.

Table 3.3 - *Linkage disequilibrium: p-values of the test executed for each pair of loci for each population; $p > 0.00007$ (corrected threshold through the Bonferroni procedure) shows no linkage between loci. The empty cells indicate the impossibility of calculation.*

Locus 1	Locus 2	Valori di p per popolazione				
		CBA	MOL	SPT	SBE	CPA
D6Mit138	D6Mit26	1.00000	1.00000	0.06895	0.14130	0.41356
D6Mit138	D9Mit251	0.42709	0.58807	0.57905	0.14992	0.10661
D6Mit26	D9Mit251	0.13969	1.00000	0.14902	0.90246	0.02684
D6Mit138	D9Mit52	0.11694	0.49167	0.56428	1.00000	0.51095
D6Mit26	D9Mit52	1.00000	0.38445	0.19404	0.27213	0.04028
D9Mit251	D9Mit52	0.27194	0.63683	0.26142	0.44598	0.14695
D6Mit138	D10Mit75	0.64315	0.63879	1.00000	1.00000	0.16198
D6Mit26	D10Mit75	1.00000	1.00000	1.00000	0.83922	0.09582
D9Mit251	D10Mit75	1.00000	0.32330	1.00000	0.13695	0.03883
D9Mit52	D10Mit75	0.71492	0.67427	1.00000	1.00000	0.86338
D6Mit138	D10Mit103	0.66655	0.39601	1.00000	0.60082	0.57144
D6Mit26	D10Mit103	1.00000	1.00000	1.00000	0.98823	0.04212
D9Mit251	D10Mit103	1.00000	0.90362	0.58905	0.21555	0.12789
D9Mit52	D10Mit103	1.00000	0.02573	1.00000	1.00000	0.34314
D10Mit75	D10Mit103	0.71619	1.00000	1.00000	0.02828	0.11724
D6Mit138	D11Mit74	0.66560	0.54402	0.44311	0.04327	0.02469
D6Mit26	D11Mit74	1.00000	0.79385	0.06017	0.37265	0.02546
D9Mit251	D11Mit74	1.00000	0.07349	0.33778	0.04531	0.04316
D9Mit52	D11Mit74	1.00000	0.59445	0.83779	0.13117	0.04079
D10Mit75	D11Mit74	0.21332	0.10074	0.12751	0.00096	0.24750
D10Mit103	D11Mit74	1.00000	0.88882	1.00000	0.03882	0.13518
D6Mit138	D11Mit61	0.78508	1.00000	0.07026	0.01877	0.18588
D6Mit26	D11Mit61	0.32171	0.27580	1.00000	0.86763	0.71230
D9Mit251	D11Mit61	0.08883	1.00000	1.00000	0.11708	0.86470
D9Mit52	D11Mit61	0.54319	1.00000	1.00000	0.07807	1.00000
D10Mit75	D11Mit61	1.00000	0.49385	1.00000	0.12776	0.85510
D10Mit103	D11Mit61	1.00000	1.00000	1.00000	0.07109	1.00000
D11Mit74	D11Mit61	1.00000	1.00000	1.00000	0.00600	0.63969
D6Mit138	D12Mit182	0.32198	0.80297	0.43557	0.00500	0.50937
D6Mit26	D12Mit182	1.00000	0.27228	0.09291	0.37061	0.12981
D9Mit251	D12Mit182	0.20822	1.00000	0.82206	0.31696	0.38022
D9Mit52	D12Mit182	1.00000	0.80124	0.76149	0.13067	0.21647
D10Mit75	D12Mit182	1.00000	0.18742	1.00000	0.64985	0.35935
D10Mit103	D12Mit182	1.00000	0.98482	0.44351	0.31980	0.35217
D11Mit74	D12Mit182	1.00000	0.57993	0.67633	0.00965	0.53395
D11Mit61	D12Mit182	0.74178	0.36381	1.00000	0.03380	0.38778
D6Mit138	D12Mit30	1.00000	0.00316	0.26735	0.28024	0.15823
D6Mit26	D12Mit30	1.00000	1.00000	1.00000	0.12043	0.89501
D9Mit251	D12Mit30	0.27595	0.82451	1.00000	0.54526	0.37259
D9Mit52	D12Mit30	1.00000	1.00000	0.57116	1.00000	1.00000
D10Mit75	D12Mit30	1.00000	0.52006	1.00000	0.03648	0.20493
D10Mit103	D12Mit30	1.00000	1.00000	1.00000	0.11463	1.00000
D11Mit74	D12Mit30	1.00000	0.35502	1.00000	0.01086	0.04713
D11Mit61	D12Mit30	0.09860	1.00000	0.06689	0.01248	1.00000
D12Mit182	D12Mit30	0.42992	0.27272	1.00000	0.64705	0.58106
D6Mit138	D19Mit94	0.78722	0.11991	1.00000	0.04390	0.77394
D6Mit26	D19Mit94	1.00000	1.00000	0.38664	0.44329	0.44913
D9Mit251	D19Mit94	0.13413	0.05193	0.08311	0.13864	0.17766
D9Mit52	D19Mit94	0.38414	1.00000	1.00000	0.20046	0.54424
D10Mit75	D19Mit94	1.00000	0.21986	1.00000	0.28293	0.17080
D10Mit103	D19Mit94	0.38812	1.00000	0.20686	0.12353	1.00000
D11Mit74	D19Mit94	1.00000	0.04748	0.34004	0.00815	0.04199
D11Mit61	D19Mit94	0.61524	1.00000	1.00000	0.00394	1.00000
D12Mit182	D19Mit94	0.87019	0.18861	1.00000	0.21016	1.00000
D12Mit30	D19Mit94	1.00000	1.00000	1.00000	0.00158	0.46891
D6Mit138	D19Mit6	0.66698	0.04910	0.00209	0.00411	0.69619
D6Mit26	D19Mit6	1.00000	1.00000	0.01579	0.22792	0.11444
D9Mit251	D19Mit6	1.00000	0.82725	0.33391	0.24721	0.05239
D9Mit52	D19Mit6	1.00000	0.39017	0.34421	0.03224	1.00000
D10Mit75	D19Mit6	1.00000	1.00000	1.00000	0.39244	0.04848
D10Mit103	D19Mit6	1.00000	0.00987	1.00000	0.22757	0.43639
D11Mit74	D19Mit6	1.00000	0.36949	0.23965	0.03575	0.72816
D11Mit61	D19Mit6	0.54045	1.00000	1.00000	0.06881	0.49709
D12Mit182	D19Mit6	0.42795	0.89032	0.24563	0.06825	0.76302
D12Mit30	D19Mit6	1.00000	0.27632	1.00000	0.05587	0.25550
D19Mit94	D19Mit6	1.00000	1.00000	1.00000	0.00205	0.41356

Locus 1	Locus 2	Valori di p per popolazione				
		SAL	MDM	MMP	GRA	MNT
D6Mit138	D6Mit26	1.00000	0.17840	0.99538	1.00000	0.79287
D6Mit138	D9Mit251	0.13196	0.13101	0.47715	0.31549	0.20602
D6Mit26	D9Mit251	1.00000	0.21045	0.57994	1.00000	1.00000
D6Mit138	D9Mit52	0.13646	0.71371	0.15106	0.25727	0.30643
D6Mit26	D9Mit52	1.00000	0.11771	1.00000	1.00000	0.65117
D9Mit251	D9Mit52	0.06647	0.93345	0.69649	1.00000	0.49286
D6Mit138	D10Mit75	0.13148	0.06083	0.18516	0.14091	0.58064
D6Mit26	D10Mit75	1.00000	0.18331	1.00000	0.68025	0.58199
D9Mit251	D10Mit75	1.00000	0.88202	0.11899	1.00000	0.45114
D9Mit52	D10Mit75	1.00000	0.75302	0.52093	0.44843	0.12826
D6Mit138	D10Mit103	0.24712	0.95393	1.00000	0.02142	0.63825
D6Mit26	D10Mit103	1.00000	0.24859	1.00000	1.00000	0.61188
D9Mit251	D10Mit103	1.00000	0.96001	1.00000	1.00000	0.49791
D9Mit52	D10Mit103	1.00000	0.92194	1.00000	0.21329	0.82347
D10Mit75	D10Mit103	0.13264	0.53250	0.08902	0.01720	1.00000
D6Mit138	D11Mit74	1.00000	0.89105	0.29815	1.00000	0.83677
D6Mit26	D11Mit74	1.00000	0.12758	0.87956	1.00000	0.47634
D9Mit251	D11Mit74	1.00000	0.51421	0.98840	1.00000	0.37827
D9Mit52	D11Mit74	1.00000	0.20407	0.62380	0.19220	0.19086
D10Mit75	D11Mit74	1.00000	0.72997	0.85999	1.00000	1.00000
D10Mit103	D11Mit74	1.00000	0.24033	1.00000	1.00000	0.23800
D6Mit138	D11Mit61	-	0.34352	0.49041	0.36525	0.44249
D6Mit26	D11Mit61	-	1.00000	1.00000	0.41761	1.00000
D9Mit251	D11Mit61	-	0.06977	0.29947	1.00000	0.38785
D9Mit52	D11Mit61	-	0.41236	0.18480	1.00000	0.71578
D10Mit75	D11Mit61	-	0.80674	0.08983	0.55828	0.63430
D10Mit103	D11Mit61	-	1.00000	1.00000	0.27807	0.22266
D11Mit74	D11Mit61	-	0.78745	0.90947	0.27114	0.53372
D6Mit138	D12Mit182	-	0.53387	0.15992	0.31685	0.86711
D6Mit26	D12Mit182	-	0.51492	0.50616	0.01559	0.51233
D9Mit251	D12Mit182	-	0.50725	0.09817	0.67347	0.37392
D9Mit52	D12Mit182	-	0.79105	1.00000	0.61865	0.00567
D10Mit75	D12Mit182	-	0.78502	0.05348	0.13973	0.16724
D10Mit103	D12Mit182	-	0.06478	1.00000	0.15805	0.68470
D11Mit74	D12Mit182	-	0.40956	0.55062	0.59731	0.01096
D11Mit61	D12Mit182	-	0.66459	0.31566	0.01815	1.00000
D6Mit138	D12Mit30	-	0.14575	0.90353	0.47586	0.09534
D6Mit26	D12Mit30	-	0.20852	1.00000	1.00000	0.88359
D9Mit251	D12Mit30	-	0.01688	0.18052	0.42471	0.27217
D9Mit52	D12Mit30	-	0.69247	0.47409	1.00000	0.00272
D10Mit75	D12Mit30	-	0.79331	0.22511	0.71063	0.36967
D10Mit103	D12Mit30	-	0.94152	1.00000	1.00000	0.79117
D11Mit74	D12Mit30	-	0.05287	0.78012	0.36734	0.59600
D11Mit61	D12Mit30	-	0.53955	0.53366	1.00000	0.92422
D12Mit182	D12Mit30	-	0.77862	0.63627	0.88303	0.01941
D6Mit138	D19Mit94	-	0.27258	0.10351	1.00000	0.08366
D6Mit26	D19Mit94	-	0.86832	0.55139	0.28634	1.00000
D9Mit251	D19Mit94	-	0.07406	0.77228	1.00000	0.16606
D9Mit52	D19Mit94	-	0.80578	0.38372	0.15002	0.34719
D10Mit75	D19Mit94	-	0.07101	0.11763	1.00000	0.28956
D10Mit103	D19Mit94	-	1.00000	0.29870	1.00000	1.00000
D11Mit74	D19Mit94	-	0.26601	0.24586	1.00000	1.00000
D11Mit61	D19Mit94	-	0.29399	0.46772	1.00000	0.24328
D12Mit182	D19Mit94	-	0.69305	0.91618	1.00000	1.00000
D12Mit30	D19Mit94	-	0.36537	0.71935	0.29998	0.00639
D6Mit138	D19Mit6	1.00000	0.98558	0.43808	1.00000	0.98551
D6Mit26	D19Mit6	1.00000	0.94182	0.48563	1.00000	0.72784
D9Mit251	D19Mit6	1.00000	0.41990	0.19892	1.00000	1.00000
D9Mit52	D19Mit6	1.00000	0.09046	1.00000	1.00000	0.44608
D10Mit75	D19Mit6	1.00000	0.70042	0.24653	0.45792	0.86165
D10Mit103	D19Mit6	1.00000	0.46394	1.00000	1.00000	0.89348
D11Mit74	D19Mit6	1.00000	0.16762	0.83173	0.01038	0.78775
D11Mit61	D19Mit6	-	0.02319	0.40328	1.00000	0.32354
D12Mit182	D19Mit6	-	0.27244	0.23570	1.00000	0.29697
D12Mit30	D19Mit6	-	0.17840	0.99538	0.37121	0.38819
D19Mit94	D19Mit6	-	0.13101	0.47715	1.00000	1.00000

3.2.1.3 - Differenziamento delle popolazioni

La statistica F di Wright (1951) ha mostrato indici di strutturazione alti, con un valore di $F_{ST}(\theta)$ totale per tutte le popolazioni pari a 0.133 (tabella 3.4), altamente significativo. L'analisi condotta fra tutte le possibili coppie di popolazioni ha confermato un notevole differenziamento. Come evidenziato in tabella 3.5, i valori di F_{ST} fra popolazioni variano da un minimo di 0.056 (SPT-SBE), ad un massimo di 0.259 (CBA-MMP); inoltre, solo 4 confronti effettuati (SPT-SBE, SBE-SAL, CPA-SAL e SAL-GRA) su un totale di 45, hanno rivelato differenze non significative.

Il netto differenziamento fra le popolazioni è emerso anche dalla statistica R (Slatkin, 1995), che ha mostrato un valore di $R_{ST}(\rho)$ per tutte le popolazioni alto, 0.243, e significativo. I valori di R_{ST} fra coppie di popolazione, valore minimo 0.016 (SAL-SBE), valore massimo 0.543 (CBA-MDM) variano in modo molto più accentuato rispetto a quelli di F_{ST} (tendenza dovuta al modello di evoluzione *step-wise* su cui si basa la statistica R ed alle possibili stime non corrette dovute alla struttura dei dati in esame (Gaggiotti *et al.*, 1999). Solo 13 confronti fra coppie di popolazioni, su 45 effettuati, si sono rivelati non significativi (tabella 3.5).

Il modello emerso dalla statistica F ed R è stato confermato dall'analisi della distanza genetica, D (Nei, 1978). Questa ha riportato un valore totale fra le popolazioni molto alto, pari a 0.614, ed alti valori di D fra coppie di popolazioni (tabella 3.6), con variazioni comprese fra un minimo di 0.258 (SPT-SBE) ad un massimo di 1.229 (CBA-MMP).

Un'ulteriore conferma del marcato differenziamento delle popolazioni è stato fornito dal *test* genico e da quello genotipico. Il primo misura le differenze fra le popolazioni in base alla distribuzione allelica all'interno di esse, il secondo misura le differenze genotipiche. In entrambi i casi è stata rigettata l'ipotesi nulla: "la distribuzione allelica e genotipica è identica fra le popolazioni". Infatti, sia la differenziazione genica e genotipica calcolate per ogni locus su tutte le popolazioni, che la stessa differenziazione calcolata per ogni coppia di popolazioni su tutti i loci, sono risultate altamente significative ($p < 0.0034$ per i *test* sui singoli loci su tutte le popolazioni, $p < 0.0011$ per i *test* fra coppie di popolazioni su tutti i loci; valori soglia corretti tramite la procedura di Bonferroni).

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
D6Mit138	0.1755	0.3488	0.2101
D6Mit26	0.2077	0.2463	0.0530
D9Mit251	0.1873	0.3527	0.2135
D9Mit52	0.1196	0.2080	0.1004
D10Mit75	0.1814	0.3120	0.1680
D10Mit103	0.1647	0.2077	0.0560
D11Mit74	0.1929	0.3509	0.2061
D11Mit61	0.1698	0.2370	0.0809
D12Mit182	0.1192	0.2807	0.1942
D12Mit30	0.1629	0.2753	0.1243
D19Mit94	0.1709	0.2512	0.1030
D19Mit6	0.1793	0.2543	0.0963
Tutti	0.1695	0.2770	0.1335

Tabella 3.4 - Valori di F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} secondo Weir e Cockerham (1984) relativi ad ogni locus calcolati su tutte le popolazioni.

Table 3.4 - F_{IS} , F_{IT} - and F_{ST} -values (Weir and Cockerham, 1984) for each locus calculated for all populations.

	CBA	MOL	SPT	SBE	CPA	SAL	MDM	MMP	GRA	MNT
CBA	-	0.206	0.334	0.383	0.403	0.363	0.543	0.265	0.350	0.340
MOL	0.102	-	0.135	0.124	0.182	0.126	0.476	0.161	0.136	0.138
SPT	0.159	0.085	-	0.097	0.175	0.145	0.420	0.271	0.089	0.168
SBE	0.124	0.064	0.056	-	0.089	0.016	0.353	0.196	0.028	0.037
CPA	0.162	0.107	0.075	0.068	-	0.029	0.363	0.257	0.163	0.163
SAL	0.163	0.101	0.089	0.077	0.067	-	0.266	0.153	0.080	0.084
MDM	0.239	0.181	0.181	0.161	0.165	0.146	-	0.385	0.348	0.337
MMP	0.259	0.188	0.196	0.188	0.183	0.183	0.258	-	0.156	0.111
GRA	0.128	0.080	0.067	0.060	0.070	0.065	0.146	0.157	-	0.038
MNT	0.173	0.128	0.116	0.105	0.132	0.118	0.199	0.194	0.092	-

Tabella 3.5 - Valori di F_{ST} (sotto in diagonale) e di R_{ST} (sopra in diagonale) per ogni coppia di popolazioni. In grassetto sono indicate le differenze significative al livello corretto secondo Bonferroni, $p < 0.001$.

Table 3.5 - F_{ST} - (below diagonal) and R_{ST} -values (above diagonal) for each pair of populations. Significance differences are marked in bold ($p < 0.001$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

	CBA	MOL	SPT	SBE	CPA	SAL	MDM	MMP	GRA	MNT
CBA	-									
MOL	0.388	-								
SPT	0.721	0.390	-							
SBE	0.516	0.283	0.258	-						
CPA	0.713	0.500	0.327	0.301	-					
SAL	0.726	0.501	0.454	0.396	0.282	-				
MDM	1.111	0.848	0.876	0.748	0.708	0.574	-			
MMP	1.229	0.870	0.975	0.979	0.823	0.807	1.291	-		
GRA	0.590	0.411	0.356	0.324	0.338	0.362	0.681	0.749	-	
MNT	0.844	0.694	0.640	0.578	0.728	0.675	1.069	0.955	0.539	-

Tabella 3.6 - Valori di distanza genetica, D (Nei, 1978), per ogni coppia di popolazioni.

Table 3.6 - Genetic distance values, D (Nei, 1978), for each pair of populations.

3.2.1.3.1 - Ipotesi di struttura

Per verificare l'esistenza di una riduzione del flusso genico attraverso l'area di ibridazione, è stato calcolato il valore medio di F_{ST} fra le popolazioni costituite da individui appartenenti alla stessa razza parentale (CD $2n = 22$: CBA e MOL e standard, $2n = 40$: GRA e MNT) e confrontato con il valore medio di F_{ST} fra le popolazioni all'interno della zona ibrida (SPT, SBE, CPA, SAL, MDM, MMP). La distanza geografica esistente fra le popolazioni della stessa razza cromosomica è minore rispetto a quella relativa alla zona di ibridazione. In caso di correlazione fra distanza genetica e distanza geografica fra le dieci popolazioni in esame, si otterrebbe una sovrastima del valore medio di F_{ST} delle popolazioni localizzate nell'area ibrida.

Quindi, prima di eseguire il confronto, è stato effettuato un *test* di Mantel per verificare la presenza di correlazione fra distanza genetica (rappresentata dalla matrice dei valori di F_{ST} fra le dieci popolazioni in esame) e distanza geografica (rappresentata dalle distanze lineari fra le stesse popolazioni). Il *test* ha mostrato una correlazione molto bassa ($r = 0.25$) e non significativa ($p = 0.83$), permettendo l'analisi sopradescritta.

La *magnitudo* del valore medio di F_{ST} fra le popolazioni appartenenti alle razze cromosomiche (0.097), minore rispetto a quella del valore medio di F_{ST} fra le popolazioni ibride (0.170), indica una lieve riduzione del flusso genico lungo l'area di ibridazione.

L'analisi gerarchica AMOVA è stata utilizzata per verificare l'esistenza di una struttura genetica all'interno dell'insieme di dati in esame. L'AMOVA è stata eseguita due volte,

analizzando prima due gruppi costituiti dalle popolazioni appartenenti alla razze cromosomiche (gruppo 1, $2n = 22$: CBA e MOL; gruppo 2, $2n = 40$: GRA e MNT), poi tre gruppi costituiti dai due precedenti e da un terzo costituito dalle popolazioni ibride (SPT, SBE, CPA, SAL, MDM, MMP). In entrambi i casi l'analisi gerarchica ha mostrato che la maggior parte della variazione genetica è dovuta alla variazione manifestata "all'interno delle popolazioni" e "fra popolazioni all'interno dei gruppi", entrambi i livelli altamente significativi (tabella 3.7 e 3.8). La variazione dovuta alla differenza "fra gruppi" si è rivelata bassa nelle due analisi, anche se più alta nella prima, e non significativa.

Da notare il consistente aumento della variazione "fra popolazioni all'interno dei gruppi" fra la prima (8.16%) e la seconda analisi (16.01%), elemento che fornisce un'indicazione indiretta dell'abbassamento del flusso genico lungo l'area di ibridazione.

L'AMOVA, quindi, ha rivelato una scarsa differenziazione fra le due razze cromosomiche, effetto dovuto ad un flusso genico consistente, anche se ridotto dalla zona di ibridazione che funge da "barriera" al libero scambio di materiale genetico.

	Gradi di libertà	Variazione (%)	Indici di fissazione	p
Fra gruppi	1	2.88	$F_{CT} = 0.026$	0.334
Fra popolazioni all'interno dei gruppi	2	8.16	$F_{SC} = 0.089$	0.000
All'interno delle popolazioni	104	88.96	$F_{ST} = 0.118$	0.000

Tabella 3.7 - Risultati dell'analisi gerarchica AMOVA. Analisi I: i gruppi sono costituiti dalle due razze cromosomiche ($CD 2n = 22$ e $2n = 40$).

Table 3.7 - AMOVA hierarchical analysis results. Analysis I: the groups are constituted by the two chromosomal races ($CD 2n = 22$ and $2n = 40$).

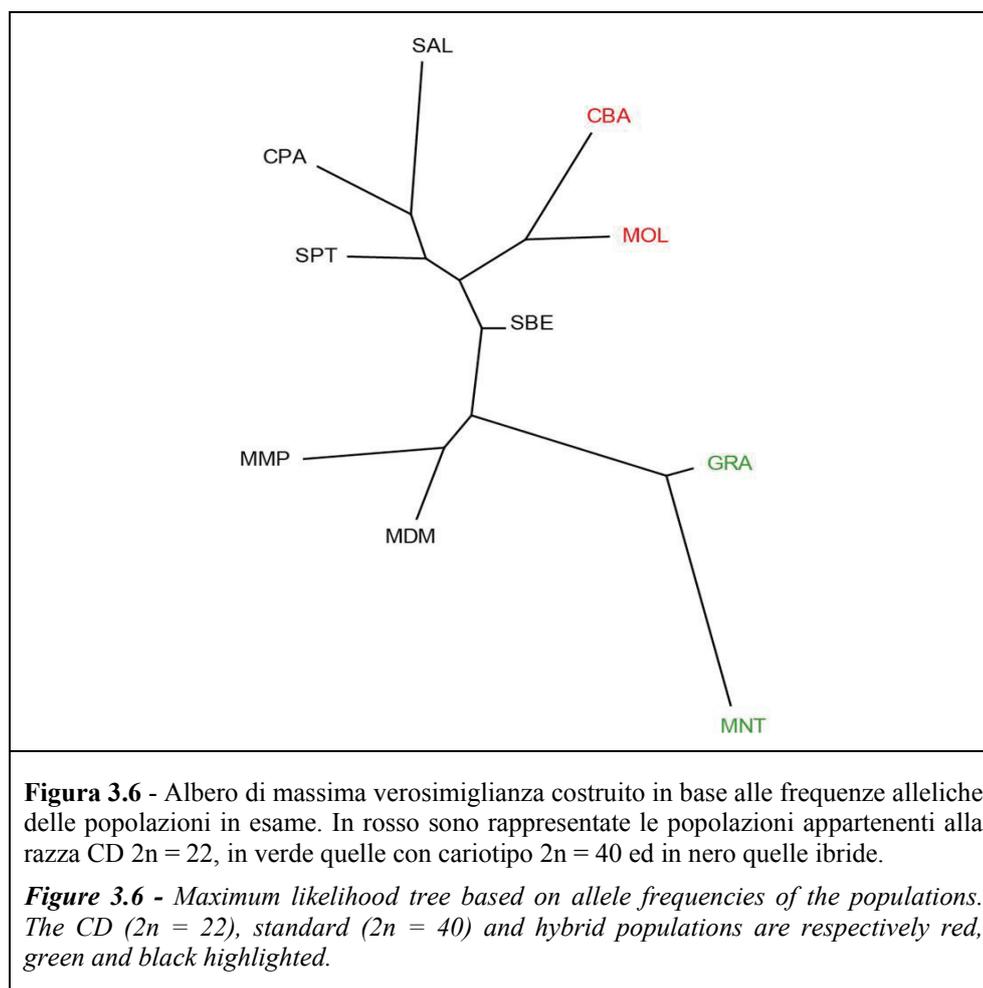
	Gradi di libertà	Variazione (%)	Indici di fissazione	p
Fra gruppi	2	0.20	$F_{CT} = 0.002$	0.511
Fra popolazioni all'interno dei gruppi	7	16.01	$F_{SC} = 0.149$	0.000
All'interno delle popolazioni	284	83.79	$F_{ST} = 0.139$	0.000

Tabella 3.8 - Risultati dell'analisi gerarchica AMOVA. Analisi II: i gruppi sono costituiti dai tre gruppi cromosomici ($CD 2n = 22$, $ACR 2n = 24$ ed ibridi).

Table 3.8 - AMOVA hierarchical analysis results. Analysis II: the groups are constituted by the three chromosomal groups ($CD 2n = 22$, $ACR 2n = 24$ and $2n = 40$).

3.2.1.3.2 - Albero di massima verosimiglianza

I rapporti reciproci fra le dieci popolazione in esame sono stati visualizzati tramite un albero di massima verosimiglianza costruito in base alle frequenze alleliche delle popolazioni stesse. In questa analisi sono stati considerati tutti i dodici loci. Le popolazioni appartenenti alla stessa razza parentale (CBA e MOL: razza CD $2n = 22$; GRA e MNT: $2n = 40$) sono molto vicine nel cladogramma di figura 3.6 e risultano distanti fra di loro. Data l'assenza di correlazione positiva fra distanza genetica e distanza geografica, che giustificherebbe le relazioni reciproche fra popolazioni (le razze cromosomiche sono localizzate alle estremità di una fascia di ibridazione di 20 Km circa e le popolazioni con lo stesso cariotipo parentale sono vicine fra di loro), il risultato ottenuto fa supporre l'esistenza di qualche meccanismo in grado di ridurre il flusso genico lungo l'area e di non ostacolarlo fra popolazioni appartenenti alla stessa razza cromosomica. MDM e MMP seguono il modello delle popolazioni con cariotipo parentale in quanto sono costituite in gran parte da individui a 40 cromosomi.



3.2.1.4 - Analisi del flusso genico posizione-dipendente

Per verificare la presenza di un flusso genico dipendente dalla posizione sul braccio cromosomico è stata eseguita un'analisi basata sulla statistica F , R e sulla distanza genetica applicata ad ognuno dei 12 loci e su due insiemi di dati contenenti rispettivamente i loci pericentromerici e telomerici. I loci del cromosoma 19, l'unico mai coinvolto in fusioni robertsoniane, sono stati esclusi da quest'ultimo esame.

Nel complesso i loci pericentromerici hanno evidenziato un differenziamento maggiore fra le popolazioni rispetto ai loci telomerici. La coppia di loci del cromosoma 19 mostra valori comparabili a quelli dei loci telomerici degli altri cromosomi. Tale modello è stato evidenziato dagli indici F_{ST} , R_{ST} e G_{ST} (tabella 3.9 e figura 3.7).

I valori di F_{ST} sono stati calcolati sui due differenti insiemi di dati descritti. L'analisi, condotta sui loci pericentromerici, ha riportato un valore calcolato su tutte le popolazioni molto alto (0.198) e significativo. I valori di F_{ST} , calcolati per ogni coppia di popolazioni, sono risultati tutti altamente significativi (tabella 3.10).

La stessa analisi, condotta sui loci telomerici, ha riportato un valore di F_{ST} totale significativo (pari a 0.089), ma più basso di quello calcolato per i loci pericentromerici; solamente 25 confronti fra coppie di popolazioni, su un totale di 45 effettuati, hanno rivelato differenze significative (tabella 3.10). I risultati ottenuti indicano come lo scambio di materiale genetico fra le popolazioni sia ostacolato in zona pericentromerica dei cromosomi.

Locus	$F_{ST} (\theta)$	$R_{ST} (\rho)$	G_{ST}
D6Mit138	0.2101	0.4398	0.1960
D6Mit26	0.0530	0.1660	0.0451
D9Mit251	0.2135	0.5982	0.1743
D9Mit52	0.1004	0.1291	0.0870
D10Mit75	0.1680	0.2996	0.1691
D10Mit103	0.0560	0.0194	0.0560
D11Mit74	0.2061	0.4908	0.1699
D11Mit61	0.0809	0.1689	0.0870
D12Mit182	0.1942	0.1348	0.1781
D12Mit30	0.1243	0.1534	0.1076
D19Mit94	0.1030	0.1842	0.0906
D19Mit6	0.0963	0.1321	0.0750
Tutti	0.1335	0.2430	0.1196

Tabella 3.9 - Valori di F_{ST} , R_{ST} e G_{ST} relativi ad ogni locus. I loci pericentromerici sono inseriti nelle caselle scure, i telomerici in quelle chiare.

Table 3.9 - F_{ST} , R_{ST} - and G_{ST} -values for each locus. Pericentromeric and telomeric loci are respectively grey and white highlighted.

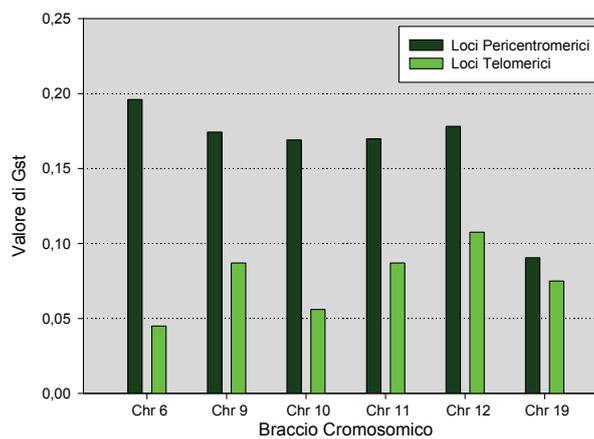
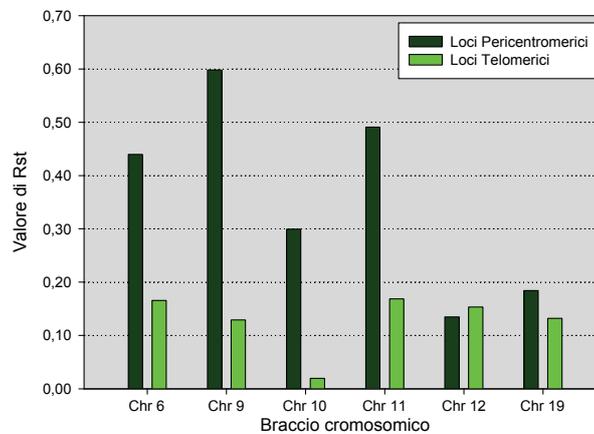
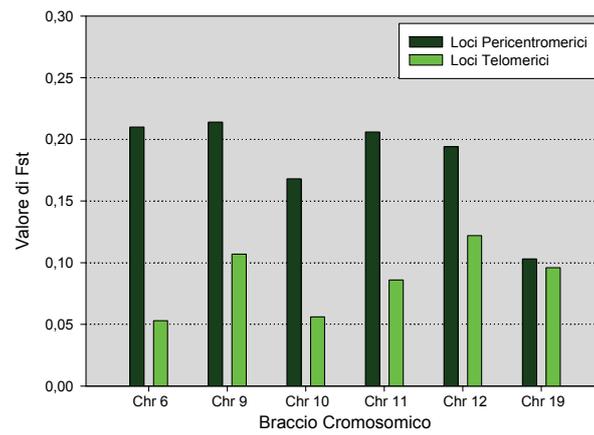


Figura 3.7 - Differenti valori di F_{ST} , R_{ST} e G_{ST} fra loci pericentromerici (barre scure) e loci telomerici (barre chiare) mostrano un diverso livello di differenziazione e quindi un differente flusso genico nell'area di ibridazione, più basso nei loci pericentromerici. "Chr x" nell'asse delle ascisse indica il braccio cromosomico.

Figure 3.7 - Different F_{ST} , R_{ST} and G_{ST} -values between pericentromeric (dark bars) and telomeric loci (light bars) show a different level of differentiation. This pattern indicates a different gene flow in the hybridization area, lower for pericentromeric loci. "Chr x" in the abscissa axes indicates the chromosome arm.

	CBA	MOL	SPT	SBE	CPA	SAL	MDM	MMP	GRA	MNT
CBA	-	0.080	0.085	0.096	0.077	0.079	0.161	0.193	0.103	0.100
MOL	0.131	-	0.017	0.039	0.045	0.035	0.085	0.124	0.037	0.082
SPT	0.261	0.180	-	0.033	0.036	0.051	0.119	0.152	0.072	0.090
SBE	0.154	0.101	0.087	-	0.023	0.068	0.099	0.149	0.057	0.091
CPA	0.268	0.199	0.123	0.103	-	0.075	0.119	0.146	0.039	0.075
SAL	0.265	0.203	0.142	0.091	0.066	-	0.102	0.113	0.063	0.063
MDM	0.355	0.303	0.288	0.232	0.229	0.211	-	0.168	0.107	0.122
MMP	0.360	0.280	0.247	0.229	0.249	0.270	0.342	-	0.117	0.120
GRA	0.186	0.149	0.084	0.072	0.118	0.085	0.215	0.221	-	0.086
MNT	0.236	0.186	0.166	0.128	0.160	0.174	0.289	0.232	0.092	-

Tabella 3.10 - Valori di F_{ST} dei loci pericentromerici (sotto in diagonale) e dei loci telomerici (sopra in diagonale) per ogni coppia di popolazioni. In grassetto sono indicate differenze significative al livello corretto secondo Bonferroni, $p < 0.001$.

Table 3.10 - Pericentromeric loci F_{ST} -values (below diagonal) and telomeric loci F_{ST} -values (above diagonal) for each pair of populations. Significance differences are marked in bold ($p < 0.001$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

Per ottenere una stima del flusso genico fra le popolazioni in esame con un diverso approccio, è stato calcolato il numero di migranti per generazione tramite il metodo degli alleli esclusivi descritto da Barton e Slatkin (1986). L'analisi, applicata ai due insiemi di dati, ha mostrato una differenza netta: solo 1.1 individui per generazione risultano migrare nell'esame dei loci pericentromerici, contro i 4.3 individui nell'analisi condotta sui loci telomerici.

L'analisi gerarchica AMOVA, eseguita indipendentemente sui 12 loci, ha rivelato una netta differenza fra i loci pericentromerici rispetto ai telomerici. I livelli gerarchici utilizzati sono gli stessi della seconda analisi AMOVA condotta su tutti loci (paragrafo 3.2.1.3.1). Dalla percentuale di variazione dovuta ai tre gruppi cromosomici (CD 2n = 22, 2n = 40 ed ibridi), è emersa una considerevole differenza fra i loci pericentromerici (variazione più alta) rispetto ai telomerici dello stesso braccio cromosomico (tabella 3.11). L'unica eccezione a questo modello è presentata dalla coppia di loci del cromosoma 19, i cui valori di variazione percentuale fra gruppi sono pari a 0. La somma delle variazioni percentuali fra gruppi dei cinque loci pericentromerici (escludendo D19Mit94) è pari a 45.69, mentre quella dei loci telomerici (escludendo D19Mit6) è pari a 3.49. In tre coppie di loci (pericentromerico-telomerico) le differenze sono molto consistenti (cromosoma 9, 11 e 12) mentre nelle altre tre coppie (cromosoma 6 e 10) le differenze, anche se è sempre il locus pericentromerico a presentare valori più alti, sono meno pronunciate. I valori negativi in tabella 3.11 sono stati

considerati 0, seguendo la descrizione dell'AMOVA *output* proposta da Schneider *et al.* (1997).

Locus	% di Variazione		
	Fra gruppi	Fra popolazioni all'interno dei gruppi	All'interno delle popolazioni
D6Mit138	2.72479	17.66969	79.60552
D6Mit26	0.87174	-0.84241	99.97068
D9Mit251	24.17420	-0.29477	76.12057
D9Mit52	2.62470	5.01240	92.36290
D10Mit75	0.40531	25.70798	73.88671
D10Mit103	-1.53938	9.41452	92.12487
D11Mit74	5.70924	3.82085	90.46991
D11Mit61	-4.33205	12.45103	91.88102
D12Mit182	12.70805	0.69648	86.59547
D12Mit30	-3.06149	15.74918	87.31231
D19Mit94	-7.30790	13.41976	93.88815
D19Mit6	-3.14770	12.02622	91.12147

Tabella 3.11 - Risultati dell'AMOVA. L'analisi gerarchica mostra le variazioni percentuali per ogni locus dovuti a tre livelli di studio: "fra gruppi" (CD 2n = 22, 2n = 40 ed ibridi), "fra popolazioni all'interno dei gruppi" e "all'interno delle popolazioni". I loci pericentromerici sono stati inseriti nelle righe scure, i telomerici in quelle chiare.

Table 3.11 - AMOVA results. Hierarchical analysis shows percentage variation for each locus due to three study levels: "between groups" (CD 2n = 22, 2n = 40 and hybrids), "between population within groups" and "within populations". Pericentromeric and telomeric loci are respectively grey and white highlighted.

3.2.1.4.1 - Alberi di massima verosimiglianza

Gli alberi di massima verosimiglianza sono stati, inoltre, costruiti in base ai due insiemi di dati (loci telomerici e pericentromerici) analizzati singolarmente. Da questo studio è emerso che i rapporti reciproci fra le popolazioni sono molto simili a quelli mostrati nell'analisi della totalità dei loci (paragrafo 3.2.1.3.2) solamente per i pericentromerici (figura 3.8). Anche in questo caso è stato eseguito un *test* di Mantel per verificare l'esistenza di correlazione fra distanza genetica (matrice degli F_{ST} calcolati utilizzando solo i loci pericentromerici) e geografica. Il *test* ha mostrato una correlazione molto bassa ($r = 0.31$) e non significativa ($p = 0.89$). L'analisi dei loci telomerici, invece, ha mostrato relazioni non congruenti con la geografia fra le popolazioni. Anche in questo caso, il *test* di Mantel effettuato con le matrici di

distanza appropriate, ha evidenziato assenza di correlazione ($r = 0.15$; $p = 0.72$). Mentre le popolazioni a 22 cromosomi (CBA e MOL) risultano contigue nell'albero di figura 3.8, le popolazioni a 40 cromosomi (MNT e GRA) sono interposte fra popolazioni ibride. I risultati mostrati da questa analisi fanno supporre che le restrizioni allo scambio di materiale genetico siano dovute in gran parte alla zona pericentrometrica piuttosto che a quella telomerica dei cromosomi.

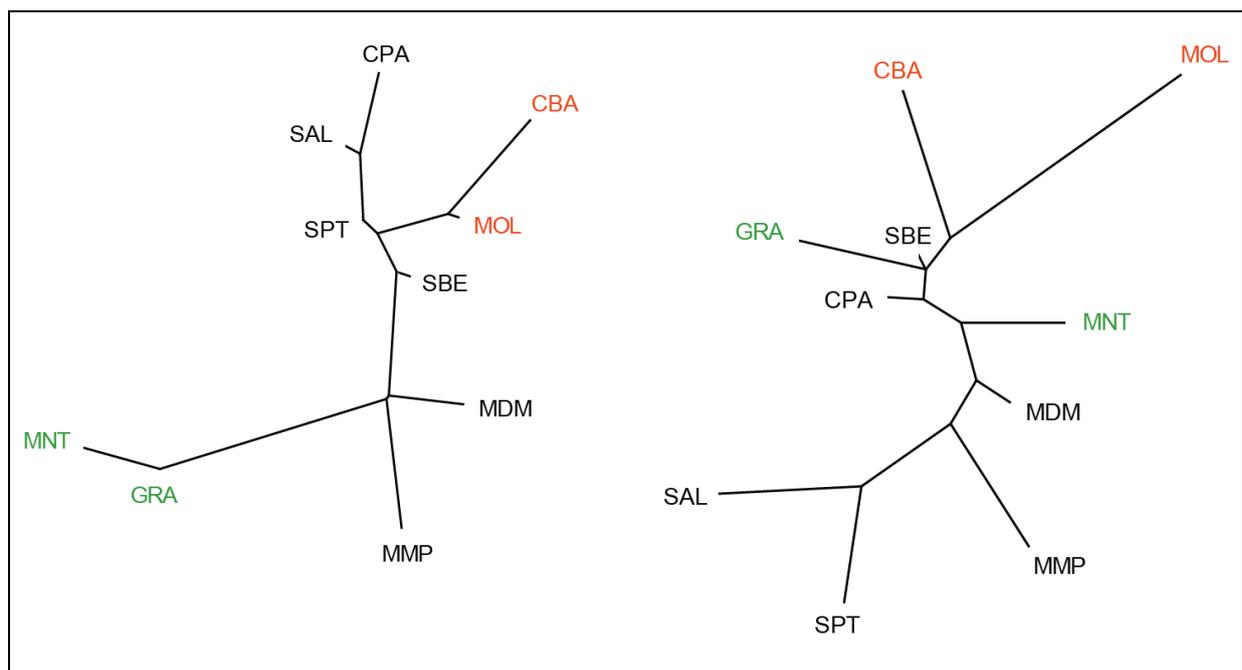


Figura 3.8 - Alberi di massima verosimiglianza costruiti in base alle frequenze alleliche delle popolazioni in esame utilizzando i loci pericentromerici (albero di sinistra) e quelli telomerici (albero di destra). In rosso sono rappresentate le popolazioni appartenenti alla razza CD $2n = 22$, in verde quelle con cariotipo $2n = 40$ ed in nero quelle ibride.

Figure 3.8 - Maximum likelihood trees based on allele frequencies of the populations. Left tree is only based on pericentromeric loci allele frequencies, right one on telomeric loci allele frequencies. The CD ($2n = 22$), standard ($2n = 40$) and hybrid populations are respectively red, green and black highlighted.

3.2.1.4.2 - Test di assegnazione

Per verificare il livello di differenziamento fra le popolazioni geografiche, è stato condotto un *test* di assegnazione degli individui tramite un algoritmo *bayesiano*. L'analisi è

stata effettuata su due campioni composti da tutte le popolazioni caratterizzate rispettivamente dai loci pericentromerici e telomerici: in entrambi i casi tutti gli individui sono stati assegnati ad un gruppo con una probabilità superiore alla soglia limite imposta (5%).

I risultati delle due analisi mostrano una netta differenza. I *dataset* dei loci pericentromerici hanno rivelato un altissimo livello di assegnazione alle popolazioni di appartenenza, infatti, 130 individui su 147 (88.4%) sono stati attribuiti correttamente. Le percentuali di assegnazione alle popolazioni hanno mostrato una variazione da un minimo di 77.7% per CPA ad un massimo di 100.0 % per CBA e MMP (tabella 3.12). L'analisi è risultata altamente significativa, infatti, la misura cumulativa della percentuale di assegnazione di ogni singolo individuo ad un gruppo scelto a priori (*quality index*), si è rivelata molto alta (85.7%).

La stessa analisi, applicata al *dataset* dei loci telomerici, ha mostrato un livello di assegnazione basso (83 individui su 147 correttamente assegnati: 56.4%) e poco significativo (*quality index* = 53.2%). Le percentuali di assegnazione alle popolazioni hanno mostrato una variazione da un minimo di 33.3% per SAL ad un massimo di 87.5% per CBA (tabella 3.13). Il basso tasso di assegnazione è anche accompagnato, quindi, da percentuali di assegnazione di ogni singolo individuo ripartite fra più popolazioni.

I dati ottenuti mostrano, in modo indiretto, come il flusso genico sia maggiore per i loci in posizione telomerica piuttosto che per quelli in posizione pericentromerica. Questi ultimi, infatti, accentuano le differenze genetiche fra le diverse popolazioni geografiche.

Popolazione	Popolazione di assegnazione										Individui correttamente assegnati
	CBA	MOL	SPT	SBE	CPA	SAL	MDM	MMP	GRA	MNT	
CBA	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0%
MOL	-	14	2	-	-	-	-	-	-	-	87.5%
SPT	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	100.0%
SBE	1	1	-	15	-	-	-	-	1	-	83.3%
CPA	-	1	1	1	14	1	-	-	-	-	77.7%
SAL	-	-	-	-	1	5	-	-	-	-	83.3%
MDM	-	-	1	-	1	-	23	-	-	-	92.0%
MMP	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	100.0%
GRA	-	-	-	-	1	-	-	1	14	-	87.5%
MNT	-	1	-	-	-	-	-	-	2	11	78.5%

Tabella 3.12 - Loci pericentromerici. Numero di individui di ogni popolazione assegnati alla popolazione di appartenenza (in grassetto) o ad una delle altre popolazioni.

Table 3.12 - Pericentromeric loci. Number of individuals in each population assigned to the origin population (bold highlighted) or to one of the other populations.

Popolazione	Popolazione di assegnazione										Individui correttamente assegnati
	CBA	MOL	SPT	SBE	CPA	SAL	MDM	MMP	GRA	MNT	
CBA	7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	87.5%
MOL	1	6	4	-	1	-	1	-	2	1	37.5%
SPT	1	2	5	1	1	-	-	-	-	1	45.4%
SBE	1	1	2	7	5	-	1	-	-	1	38.8%
CPA	-	1	2	1	8	1	-	1	4	-	44.4%
SAL	-	1	1	-	1	2	-	-	-	1	33.3%
MDM	-	1	-	-	1	2	18	-	2	1	72.0%
MMP	-	-	-	-	1	-	1	13	-	-	86.6%
GRA	-	1	-	1	3	1	-	-	8	2	50.0%
MNT	1	-	1	-	-	-	1	-	2	9	64.2%

Tabella 3.13 - Loci telomerici. Numero di individui di ogni popolazione assegnati alla popolazione di appartenenza (in grassetto) o ad una delle altre popolazioni.

Table 3.13 - Telomeric loci. Number of individuals in each population assigned to the origin population (bold highlighted) or to one of the other populations.

3.2.2 - Area di contatto: CD-ACR

L'analisi genetica inerente l'area di contatto è stata condotta sulle popolazioni evidenziate in figura 3.9 e descritte in tabella 2.3. E' stata eseguita una serie di analisi mirate alla caratterizzazione genetica delle popolazioni geografiche ed alla valutazione del grado di differenziamento fra le due razze cromosomiche in esame.

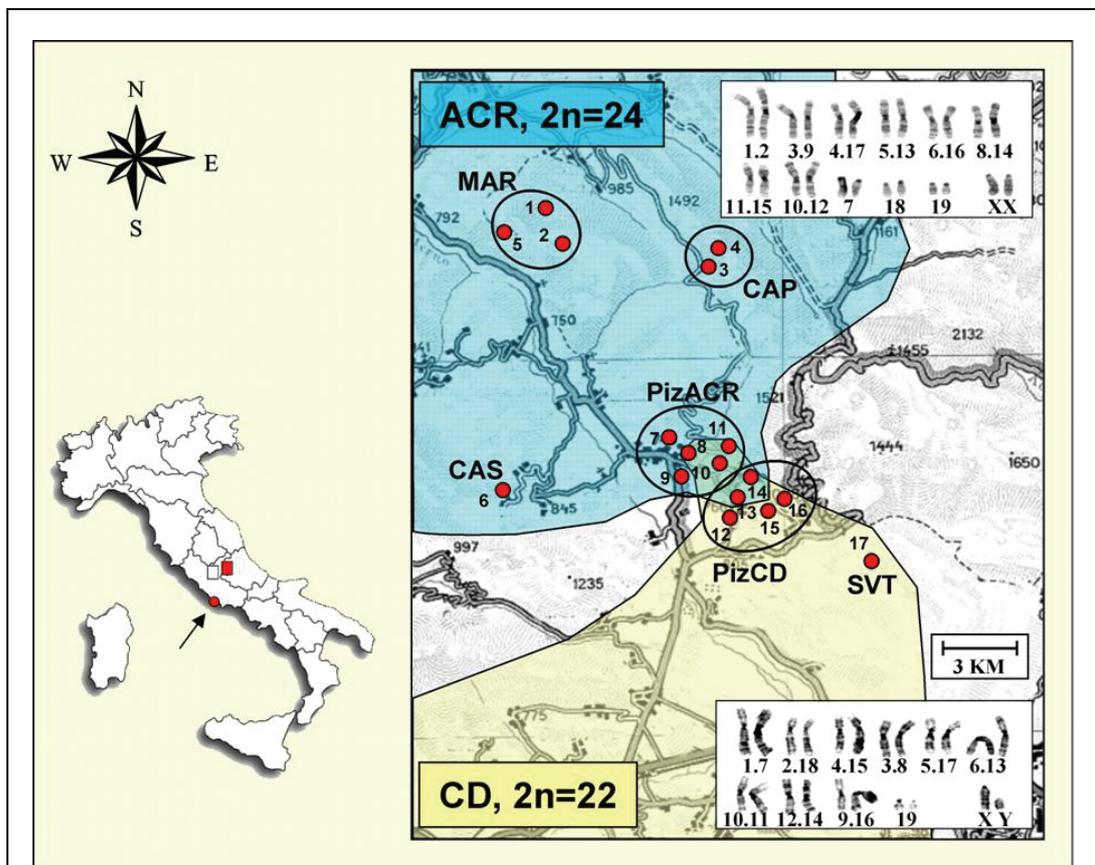


Figura 3.9 - Area di contatto. Sulla mappa sono indicate la localizzazione del campione ed il cariotipo delle razze parentali. La freccia sulla mappa di sinistra indica la popolazione di Anzio (ANZ). Le località di cattura, contrassegnate da un numero, sono descritte in appendice A e B.

Figure 3.9 - Contact area. Location of the sample and karyotype of parental races are shown. The arrow in the left map shows the population of Anzio (ANZ). The caught sites, marked with a number, are described in the appendices A and B.

3.2.2.1 - Caratterizzazione genetica delle popolazioni

Le analisi genetiche sono state eseguite su 8 loci microsatelliti (tabella 2.1). Utilizzando i relativi *primer* sono stati genotipizzati un totale di 88 individui appartenenti alle 6 popolazioni mostrate nella figura 3.9.

Nella tabella 3.14 sono riportati i dati riguardanti il numero di alleli, le frequenze alleliche, l'eterozigosi attesa e osservata, gli alleli esclusivi e il numero medio di alleli per ogni popolazione. Il locus con il maggior numero di forme alleliche risulta essere il D19Mit94 (12 alleli), mentre quello con un minor grado di poliformismo è il D6Mit26 (4 alleli). Il numero medio di alleli varia da 3.9 per la popolazione di dimensioni più ridotte, SVT, a 4.89 per la popolazione PizACR. Il numero di alleli esclusivi varia da 0 per la popolazione CAS a 5 per la popolazione PizCD. A differenza della zona di ibridazione, escludendo il cromosoma 19, i loci pericentromerici presentano un numero comparabile di alleli esclusivi, 2, rispetto a quelli dei loci telomerici, 3. I livelli di eterozigosi osservata variano da 0.456 per PizCD a 0.703 per SVT.

Tabella 3.14 - Frequenze alleliche, eterozigosi attesa (H_e), osservata (H_o) e numero di alleli (n) per gli 8 loci microsatelliti per ogni popolazione. La dimensione del campione è indicata fra parentesi. Gli alleli esclusivi e la frequenza corrispondente è indicata in grassetto. L'eterozigosi osservata ($H_{o-overall}$) e attesa ($H_{e-overall}$) per le 6 popolazioni calcolate su tutti i loci, il numero di alleli esclusivi (NPA), la proporzione di alleli esclusivi per locus (PPA) e il numero medio di alleli per locus (MNA) per ogni popolazione sono indicati in fondo alla tabella 3.14.

Table 3.14 - Allele frequencies observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, number of alleles (n) for the 8 microsatellite loci for each population. Sample size is put in brackets. Private alleles and their corresponding frequencies are in bold. Observed ($H_{o-overall}$) and expected ($H_{e-overall}$) heterozygosities for the 6 populations calculated over all loci, total number of private alleles (NPA), proportion of private alleles per locus (PPA) and mean number of alleles per locus (MNA) for each population are given at the bottom of table 3.14.

Locus	Allele	Popolazione*					
		SVT (3)	PizCD (18)	PizACR (34)	CAP (9)	CAS (20)	MAR (4)
D6Mit138	111	-	0.0556	-	-	-	-
	115	0.1667	0.3889	0.4412	0.0556	0.2250	-
	119	-	0.0556	0.0441	0.4444	-	-
	123	0.5000	0.2778	0.0735	0.1667	0.1750	0.1250
	127	-	0.1111	0.1176	0.0556	0.5750	0.3750
	131	0.3333	0.1111	0.1324	0.1667	0.0250	-
	135	-	-	0.1471	-	-	0.3750
	139	-	-	0.0441	0.1111	-	0.1250
	H_e		0.7333	0.7619	0.7542	0.7712	0.6026
H_o		0.6667	0.6667	0.6765	0.6667	0.5500	1.0000
n		3	6	7	6	4	4

Locus	Allele	Popolazione*					
		SVT (3)	PizCD (18)	PizACR (34)	CAP (9)	CAS (20)	MAR (4)
D6Mit26	190	0.3333	0.5278	0.5147	0.5000	0.8750	0.2500
	192	0.3333	0.1389	0.3971	0.5000	0.0500	0.5000
	194	0.3333	0.3333	-	-	-	-
	198	-	-	0.0882	-	0.0750	0.2500
	H_e	0.8000	0.6079	0.5781	0.5294	0.2321	0.7143
H_o	0.6667	0.3889	0.5882	0.7778	0.2500	0.7500	
n		3	3	3	2	3	3
D9Mit251	129	-	-	0.0441	-	-	-
	131	0.1667	0.1389	-	-	-	-
	133	-	-	0.0588	-	0.0500	0.1250
	135	0.5000	0.8056	0.6471	0.6667	0.1250	0.8750
	137	0.1667	-	0.0441	-	0.2250	-
	139	0.1667	0.0556	0.2059	0.3333	0.6000	-
	H_e	0.8000	0.3381	0.5395	0.4706	0.5859	0.2500
H_o	0.6667	0.2778	0.5588	0.4444	0.5500	0.2500	
n		4	3	5	2	4	2
D9Mit52	170	-	0.0278	0.2059	0.1111	0.3000	-
	172	-	0.0278	-	-	-	-
	174	-	0.0278	-	-	-	-
	176	0.1667	0.0278	-	-	-	-
	178	0.1667	0.1667	0.1471	0.4444	0.3500	-
	180	0.6667	0.3611	0.0735	0.2222	0.3500	1.0000
	182	-	0.3333	0.1618	-	-	-
	184	-	0.0278	0.4118	0.2222	-	-
	H_e	0.6000	0.7476	0.7458	0.7320	0.6821	-
H_o	0.6667	0.6667	0.5588	0.6667	0.6000	-	
n		3	8	5	4	3	1
D12Mit182	140	0.1667	0.8056	0.1471	0.8333	0.2000	0.1250
	142	0.6667	0.1667	-	-	-	-
	144	0.1667	0.0278	-	-	-	-
	152	-	-	0.2059	-	0.3250	-
	154	-	-	0.6471	0.1667	0.4750	0.8750
	H_e	0.6000	0.3317	0.5250	0.2941	0.6449	0.2500
H_o	0.6667	0.1111	0.4706	0.3333	0.8500	0.2500	
n		3	3	3	3	3	2
D12Mit30	105	0.3333	0.0278	-	-	-	-
	107	0.3333	0.5000	-	-	-	-
	109	-	0.2500	0.5294	0.1111	-	-
	111	0.3333	0.2222	0.0588	0.1667	0.5500	0.6250
	113	-	-	0.1618	0.3889	0.4500	-
	115	-	-	0.0882	0.1667	-	0.3750
	117	-	-	0.0147	0.1667	-	-
	127	-	-	0.1471	-	-	-
	H_e	0.8000	0.6556	0.6703	0.7974	0.5077	0.5357
H_o	1.0000	0.6667	0.3529	0.8889	0.2000	0.7500	
n		3	4	6	5	2	2

Locus	Allele	Popolazione*					
		SVT (3)	PizCD (18)	PizACR (34)	CAP (9)	CAS (20)	MAR (4)
D19Mit94	81	-	-	0.2941	0.2222	0.1250	0.2500
	89	0.3333	-	-	-	-	-
	91	-	-	-	-	-	0.1250
	93	-	0.3056	-	0.0556	-	0.1250
	95	-	0.1111	0.4265	0.3333	0.6250	0.3750
	97	-	-	0.0882	-	0.0250	-
	99	-	-	0.0147	-	0.2250	-
	101	-	-	-	0.2222	-	0.1250
	103	-	-	0.0294	0.1667	-	-
	105	0.5000	0.2500	0.0147	-	-	-
	107	-	0.0833	-	-	-	-
	109	0.1667	0.2500	0.1324	-	-	-
	H _c		0.7333	0.7841	0.7155	0.8039	0.5564
H _o		0.3333	0.5556	0.6471	0.6667	0.7000	0.7500
n		3	5	7	5	4	5
D19Mit6	93	-	-	0.1471	-	-	-
	95	0.3333	0.6111	0.3676	0.2222	0.2750	0.2500
	97	0.1667	0.1111	0.3088	0.3889	0.4000	0.6250
	99	0.1667	0.0556	0.0735	0.0556	0.0500	-
	101	0.3333	0.1667	0.1029	0.0556	0.2750	0.1250
	103	-	-	-	0.2778	-	-
	111	-	0.0556	-	-	-	-
	H _c		0.8667	0.5968	0.7428	0.7582	0.7038
H _o		1.0000	0.3333	0.7353	0.7778	0.5500	0.5000
n		4	5	5	5	4	3
H _c -overall		0.7407	0.5834	0.6505	0.6492	0.5560	0.4722
H _o -overall		0.7037	0.4568	0.5523	0.6790	0.5167	0.5000
NPA		1	5	3	1	0	1
PPA		0.12	0.62	0.37	0.12	0.00	0.12
MNA		3.22	4.44	4.89	3.78	3.33	2.67

* Vedi tabella 2.3 per le abbreviazioni delle popolazioni.

3.2.2.2 - Equilibrio di Hardy-Weinberg e *linkage disequilibrium*

Nella tabella 3.15 vengono riportati i risultati del *p-test* per l'equilibrio di Hardy-Weinberg (H-W) eseguito in ciascuna popolazione per ognuno degli 8 loci. Come si osserva dai valori in grassetto, solo le popolazioni SVT, CAS, CAP e MAR sono in equilibrio di H-W per tutti i loci, mentre le popolazioni PizCD e PizACR deviano significativamente da tale equilibrio per il locus D19Mit6 (PizCD) e per i loci D9Mit52 e D12Mit30 (PizACR). Queste tre popolazioni mostrano un deficit di eterozigoti ai loci indicati.

Nessuno dei loci presenta, quindi, deviazioni significative ricorrenti in più popolazioni, giustificandone l'utilizzo per le successive analisi sul differenziamento delle popolazioni.

L'analisi dell'indipendenza dei loci, valutata tramite un *test* esatto di Fischer, ha mostrato l'assenza di *linkage* fra tutte le possibili coppie di loci in ogni popolazione. Questo dato, mostrato dai valori in tabella 3.16 ($p > 0.00029$ in tutte le combinazioni calcolabili; soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni) è in accordo con la mappatura dei loci. Infatti, gli 8 loci selezionati, utilizzati anche nello studio dell'area di ibridazione, si trovano su 4 braccia cromosomiche diverse e i 2 loci dello stesso braccio sono localizzati in posizione telomerica e pericentromerica.

Locus	Popolazione					
	SVT	PizCD	PizACR	CAP	CAS	MAR
D6Mit138	1.0000	0.5330	0.0879	0.1416	0.2786	0.0554
D6Mit26	0.4344	0.0230	0.2793	0.2199	1.0000	1.0000
D9Mit251	0.6197	0.5145	0.2180	1.0000	0.0394	1.0000
D9Mit52	1.0000	0.0669	0.0000	0.0263	0.2519	-
D12Mit182	1.0000	0.0016	0.0079	1.0000	0.2553	1.0000
D12Mit30	1.0000	0.0462	0.0000	0.6058	0.0077	1.0000
D19Mit94	0.2247	0.0045	0.3641	0.2832	0.7728	0.6453
D19Mit6	1.0000	0.0005	0.4713	0.6386	0.0474	0.4304

Tabella 3.15 - Valori di *p* del *test* per l'equilibrio di Hardy-Weinberg eseguito in ciascuna popolazione per ogni locus. In grassetto sono evidenziati valori che indicano deviazioni significative da H-W ($p < 0.0010$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.15 - *Hardy-Weinberg equilibrium: p-values of the test executed in each population for each locus. The values that indicate significance deviations from H-W ($p < 0.0010$, corrected threshold through the Bonferroni procedure) are shown in bold.*

Tabella 3.16 - Valori di p per il *test* sul *linkage disequilibrium* calcolato per ogni coppia di loci per ogni popolazione; $p > 0.00029$ (soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni) indica assenza di *linkage* fra i loci in esame. Le caselle prive del valore di p indicano impossibilità di calcolo.

Table 3.16 - *Linkage disequilibrium: p-values of the test executed for each pair of loci for each population; $p > 0.00029$ (corrected threshold through the Bonferroni procedure) shows no linkage between loci. The empty cells indicate the impossibility of calculation.*

Locus 1	Locus 2	Valori di p per popolazione					
		SVT	PizCD	PizACR	CAP	CAS	MAR
D6Mit138	D6Mit26	-	0.75575	0.64935	0.16798	0.90815	1.00000
D6Mit138	D9Mit251	-	0.28220	0.01945	0.31632	0.05118	-
D6Mit26	D9Mit251	-	0.51621	0.42846	0.55653	0.18456	-
D6Mit138	D9Mit52	-	0.78759	0.26821	1.00000	0.80089	-
D6Mit26	D9Mit52	-	0.80324	0.02814	0.83308	0.86308	-
D9Mit251	D9Mit52	-	0.19980	0.33081	0.50277	0.62116	1.00000
D6Mit138	D12Mit182	-	0.44372	0.06235	0.10772	0.73559	-
D6Mit26	D12Mit182	-	0.76441	0.62978	1.00000	1.00000	0.24968
D9Mit251	D12Mit182	-	0.55365	0.09316	0.09509	0.81704	-
D9Mit52	D12Mit182	-	0.08255	0.09029	0.80934	0.08655	0.25012
D6Mit138	D12Mit30	-	0.77421	0.88339	0.02350	0.38926	-
D6Mit26	D12Mit30	-	0.34591	0.46780	0.66504	0.01793	1.00000
D9Mit251	D12Mit30	-	0.04938	0.64636	0.27585	0.03313	-
D9Mit52	D12Mit30	-	0.96829	0.89265	0.54524	0.18942	1.00000
D12Mit182	D12Mit30	-	0.52002	0.07128	0.11996	0.00149	-
D6Mit138	D19Mit94	-	0.28352	0.04189	1.00000	0.24407	-
D6Mit26	D19Mit94	-	0.11946	0.70389	0.27675	0.13184	-
D9Mit251	D19Mit94	-	0.07027	0.52915	1.00000	0.20235	-
D9Mit52	D19Mit94	-	0.91990	0.02168	0.39910	0.71183	-
D12Mit182	D19Mit94	-	0.47310	0.24562	0.76313	0.93544	-
D12Mit30	D19Mit94	-	0.76721	0.30725	1.00000	0.06662	1.00000
D6Mit138	D19Mit6	-	0.82166	0.02970	1.00000	0.23257	-
D6Mit26	D19Mit6	-	0.22674	0.44184	1.00000	0.30306	0.49986
D9Mit251	D19Mit6	-	0.72076	0.15357	0.69491	0.22520	-
D9Mit52	D19Mit6	-	0.97609	0.57612	0.55035	0.47118	0.49894
D12Mit182	D19Mit6	-	0.84869	0.41864	0.11869	0.86334	1.00000
D12Mit30	D19Mit6	-	0.58573	0.18062	1.00000	0.94199	-
D19Mit94	D19Mit6	-	0.00944	0.15175	0.15708	0.86172	-

3.2.2.3 - Differenziamento delle popolazioni

La statistica F di Wright (1951) ha mostrato indici di strutturazione alti, con un valore di $F_{ST}(\theta)$ totale per tutte le popolazioni pari a 0.187 (tabella 3.17), altamente significativo. I confronti a coppie fra le 6 popolazioni in esame hanno presentato valori di F_{ST} compresi fra 0.085 (SVT-PizCD) e 0.269 (PizCD-CAS). L'unico confronto che ha rivelato un differenziamento non significativo è stato quello fra le due popolazioni appartenenti alla razza CD 2n=22 (SVT-PizCD). Da notare l'alto valore di F_{ST} fra le popolazione PizCD e PizACR, distanti meno di un chilometro, senza la presenza di evidenti barriere geografiche, ma appartenenti a due razze cromosomiche diverse (tabella 3.18).

La statistica R ha mostrato un alto valore di $R_{ST}(\rho)$, per tutte le popolazioni, alto (0.210) e significativo. I valori di R_{ST} fra coppie di popolazioni (tabella 3.18) hanno presentato

una variazione compresa fra un minimo di 0.043 (SVT-PizCD) ed un massimo di 0.489 (PizCD-MAR). Cinque confronti su 15 si sono rivelati non significativi. Come per la statistica F , le due popolazioni appartenenti alla razza CD hanno presentato differenze non significative e l'unica popolazione significativamente diversa da tutte le altre si è rivelata CAS, la più isolata geograficamente.

Il modello emerso dalla statistica F ed R è stato confermato dall'analisi della distanza genetica, D (Nei, 1978). Questa ha riportato un valore totale fra le popolazioni molto alto, pari a 0.462, ed alti valori di D fra coppie di popolazioni (tabella 3.19), con variazioni comprese fra un minimo di 0.136 (SVT-PizCD) ad un massimo di 0.724 (PizCD-CAS).

Un ulteriore conferma del marcato differenziamento delle popolazioni è stato fornito dal *test* genico e da quello genotipico. Il primo misura le differenze fra le popolazioni in base alla distribuzione allelica all'interno di esse, il secondo misura le differenze genotipiche. La differenziazione genica e genotipica, calcolata per ogni locus su tutte le popolazioni, è risultata significativa ($p < 0.033$, valore corretto tramite la procedura di Bonferroni). La stessa differenziazione, calcolata per ogni coppia di popolazioni su tutti i loci, si è rivelata non significativa ($p > 0.012$, valore corretto secondo Bonferroni) solamente per il confronto fra le due popolazioni a 22 cromosomi (SVT e PizCD).

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
D6Mit138	0.025	0.210	0.131
D6Mit26	0.025	0.170	0.149
D9Mit251	0.042	0.249	0.194
D9Mit52	0.171	0.307	0.196
D12Mit182	0.031	0.368	0.338
D12Mit30	0.262	0.447	0.268
D19Mit94	0.105	0.233	0.143
D19Mit6	0.132	0.178	0.078
Tutti	0.115	0.275	0.187

Tabella 3.17 - Valori di F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} secondo Weir e Cockerham (1984) relativi ad ogni locus calcolati su tutte le popolazioni.

Table 3.17 - F_{IS} , F_{IT} - and F_{ST} -values (Weir and Cockerham, 1984) for each locus calculated for all populations.

	SVT	PizCD	PizACR	CAP	CAS	MAR
SVT	-	-0.043	0.201	0.099	0.282	0.305
PizCD	0.085	-	0.258	0.187	0.384	0.419
PizACR	0.191	0.179	-	0.136	0.110	0.075
CAP	0.164	0.148	0.123	-	0.161	0.277
CAS	0.239	0.269	0.168	0.189	-	0.299
MAR	0.200	0.259	0.162	0.200	0.232	-

Tabella 3.18 - Valori di F_{ST} (sotto in diagonale) e di R_{ST} (sopra in diagonale) per ogni coppia di popolazioni. In grassetto sono indicate le differenze significative al livello corretto secondo Bonferroni, $p < 0.003$.

Table 3.18 - F_{ST} - (below diagonal) and R_{ST} -values (above diagonal) for each pair of populations. Significance differences are marked in bold ($p < 0.003$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

	SVT	PizCD	PizACR	CAP	CAS	MAR
SVT	-					
PizCD	0.136	-				
PizACR	0.690	0.474	-			
CAP	0.511	0.334	0.309	-		
CAS	0.645	0.724	0.389	0.417	-	
MAR	0.428	0.626	0.364	0.439	0.455	-

Tabella 3.19 - Distanza genetica, D (Nei, 1978), per ogni coppia di popolazioni.

Table 3.19 - Genetic distance values, D (Nei, 1978), for each pair of populations.

L'analisi gerarchica AMOVA è stata utilizzata per verificare l'esistenza di un raggruppamento genetico fra le popolazioni appartenenti alle due diverse razze cromosomiche. Sono stati quindi costituiti due gruppi (gruppo 1, $2n = 22$: SVT e PizCD; gruppo 2, $2n = 24$: PizACR, CAP, CAS e MAR) ed è stata analizzata la componente di variazione esistente fra i tre livelli: "fra gruppi", "fra popolazioni all'interno dei gruppi" e "all'interno delle popolazioni". Come evidenziato dalla tabella 3.20, la maggior parte di variazione genetica è dovuta alla variazione esistente all'interno delle popolazioni e fra popolazioni all'interno dei gruppi, entrambe significative. La componente di variazione fra gruppi, a differenza di quanto emerso dall'analisi della zona di ibridazione, è alta (7.39%) e significativa ($p < 0.05$).

L'analisi dell'AMOVA condotta sulla zona di ibridazione CD-Standard ha evidenziato assenza di separazione genetica fra due razze cromosomiche distanti 20 Km (paragrafo 3.2.1.3.1, analisi I); in questo caso, invece, esiste una "struttura" nonostante il contatto fra le

due razze cromosomiche in esame. Una situazione di questo tipo fa supporre una riduzione del flusso genico fra la razza CD e la razza ACR.

	Gradi di libertà	Variazione (%)	Indici di fissazione	p
Fra gruppi	1	7.39	$F_{CT}=0.074$	0.046
Fra popolazioni all'interno dei gruppi	4	13.78	$F_{SC}=0.147$	0.000
All'interno delle popolazioni	170	78.83	$F_{ST}=0.211$	0.000

Tabella 3.20 - Risultati dell'analisi gerarchica AMOVA. I gruppi sono costituiti dalle due razze cromosomiche (CD 2n = 22 e ACR 2n = 24).

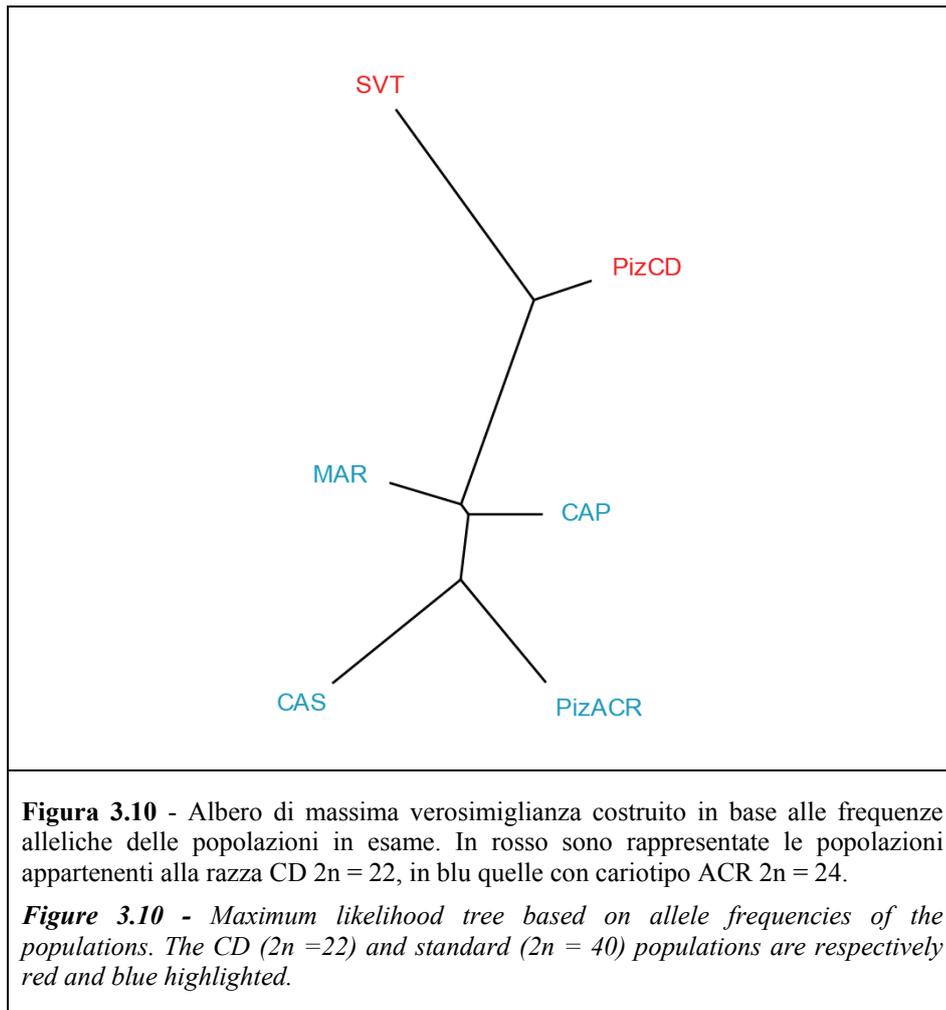
Table 3.20 - AMOVA hierarchical analysis results. The groups are constituted by the two chromosomal races (CD 2n = 22 and ACR 2n = 24).

3.2.2.3.1 - Albero di massima verosimiglianza

I rapporti reciproci fra le sei popolazioni in esame sono stati visualizzati tramite un albero di massima verosimiglianza costruito in base alle frequenze alleliche delle popolazioni stesse (figura 3.10). Le popolazioni appartenenti alle stesse razze parentali (SVT e PizCD: razza CD 2n = 22; PizACR, CAP, CAS e MAR e MNT: razza ACR 2n = 24) formano due cladi ben separati fra loro.

Un *test* di Mantel è stato effettuato per verificare la correlazione fra distanze genetica (rappresentata dalla matrice dei valori di F_{ST} fra le sei popolazioni in esame) e distanza geografica (rappresentata dalle distanze lineari fra le stesse popolazioni). La correlazione molto bassa ($r = 0.41$) e non significativa ($p = 0.91$) fa supporre che le relazioni evidenziate nel cladogramma non siano influenzate da una componente di tipo geografico.

Da notare come le popolazioni PizCD e PizACR, in contatto a livello del paese Pizzoli, siano distanti nell'albero e fra di loro siano interposte altre popolazioni a 24 cromosomi.



3.2.2.3.2 - Test di assegnazione

Per verificare il livello di differenziamento fra le razze cromosomiche e fra le popolazioni, è stato condotto un *test* di assegnazione degli individui tramite un algoritmo *bayesiano*. L'analisi è stata effettuata suddividendo il campione nelle due razze cromosomiche e, in un ulteriore livello di analisi, nelle sei popolazioni geografiche. I risultati mostrano un altissimo livello di assegnazione alle razze cromosomiche di appartenenza, infatti, 88 individui su 88 (100%) sono stati attribuiti correttamente (tabella 3.21). La significatività dell'analisi è risultata notevole, infatti, la misura cumulativa della percentuale di assegnazione di ogni singolo individuo ad un gruppo scelto a priori (*quality index*), si è rivelata molto alta (99.5%).

La stessa analisi, applicata alle popolazioni, ha mostrato un livello di assegnazione alto (79 individui su 88 correttamente assegnati: 89.7%) e significativo (*quality index* = 88.4%), ma

soprattutto ha evidenziato la netta separazione fra le popolazioni a 22 cromosomi da quelle a 24 (tabella 3.22). In entrambi i tipi di assegnazioni, popolazioni e razze, tutti gli individui sono stati assegnati ad un gruppo con una probabilità superiore alla soglia limite imposta (5%).

I due tipi di analisi indicano una suddivisione gerarchica del campione, un primo livello costituito dalle razze cromosomiche ed un secondo livello dalle popolazioni geografiche. La sottostruttura esistente all'interno delle razze è meno evidente nella razza a 22 cromosomi rispetto a quelle a 24, situazione teoricamente risultante dal maggior livello di isolamento geografico fra le popolazioni appartenenti a quest'ultima razza (figura 3.9).

Razza	Razza di assegnazione		Individui correttamente assegnati
	CD 2n = 22	ACR 2n = 24	
CD 2n=22	21	-	100%
ACR 2n=24	-	67	100%

Tabella 3.21 - Numero di individui di ogni razza cromosomica assegnati alla razza di provenienza (in grassetto) o all'altra razza.

Table 3.21 - Number of individuals in each chromosomal race assigned to the origin race (bold highlighted) or to the other race.

Popolazione	Popolazione di assegnazione						Individui correttamente assegnati
	SVT	PizCD	PizACR	CAP	CAS	MAR	
SVT	1	2	-	-	-	-	33.3%
PizCD	2	16	-	-	-	-	88.8%
PizACR	-	-	30	2	2	-	88.2%
CAP	-	-	1	8	-	-	88.8%
CAS	-	-	-	-	20	-	100%
MAR	-	-	-	-	-	4	100%

Tabella 3.22 - Numero di individui di ogni popolazione assegnati alla popolazione di appartenenza (in grassetto) o ad una delle altre popolazioni.

Table 3.22 - Number of individuals in each population assigned to the origin population (bold highlighted) or to one of the other populations.

3.2.2.3.3 - Ipotesi di struttura

Il programma STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) è stato utilizzato per verificare l'esistenza di una "struttura" all'interno dell'area di contatto. L'algoritmo del *software* ha condotto l'analisi sui genotipi degli individui privi delle informazioni relative alla popolazione

geografica di appartenenza. Sono stati saggiati valori di K (le popolazioni ipotizzate) compresi fra 1 e 6, scelta suggerita dall'alto differenziamento genetico fra le popolazioni geografiche emerso dalle analisi precedenti.

I valori più probabili sono risultati essere: $K = 2$, $K = 3$, $K = 4$ e $K = 5$ in base alle stime di $\ln P(X/K)$ corrispondenti ad ogni "corsa" dato un determinato K . La funzione $\ln P(X/K)$, che rappresenta la probabilità a posteriori di ottenere una struttura dei genotipi in esame (X), soddisfatta da K raggruppamenti, ha fornito i seguenti risultati: $K = 1$: $\ln P(X/1) = -2176.6$; $K = 2$: $\ln P(X/2) = -1897.5$; $K = 3$: $\ln P(X/3) = -1839.6$; $K = 4$: $\ln P(X/4) = -1798.1$; $K = 5$: $\ln P(X/5) = -1776.3$; $K = 6$: $\ln P(X/6) = -1799.7$. $K = 1$ è stato escluso poiché il valore $\ln P(X/1)$ minimizza in maniera drastica la corrispondente probabilità a posteriori. $K = 2, 3, 4$ e 5 hanno presentato valori di $\ln P(X/K)$ in aumento ma comparabili e quindi sono stati tenuti in considerazione (Pritchard *et al.*, 2000). $K = 6$ è risultato meno probabile in quanto il valore di $\ln P(X/6)$ ha invertito la tendenza ad aumentare della funzione $\ln P(X/K)$. Come suggerito da Pritchard *et al.* (2000), è stato ipotizzato 2 come valore di K più probabile, anche se l'alta probabilità associata agli altri K fa supporre una sottostruttura all'interno dei due raggruppamenti più probabili. Ulteriore conferma del risultato ottenuto sta nella distribuzione dei valori Q (probabilità del singolo individuo di appartenere ad una delle K popolazioni).

Dato $K = 2$, è stato ottenuto un Q medio degli 88 individui molto alto (oltre il 95%), che indica un'assegnazione molto forte ad uno dei due raggruppamenti. Anche con $K = 3, 4$ e 5 il valore medio di Q è risultato alto (oltre il 70%) che conferma la sottostruttura ipotizzata.

Ultima conferma della consistente struttura all'interno dell'insieme di dati in esame sta nella proporzione (P) del campione assegnato ad ogni gruppo K . Una situazione di simmetria ($P \sim 1/K$) indicherebbe assenza di struttura, invece, nel caso di $K = 2, 3, 4$ e 5 , P è altamente asimmetrico ($P \neq 1/K$).

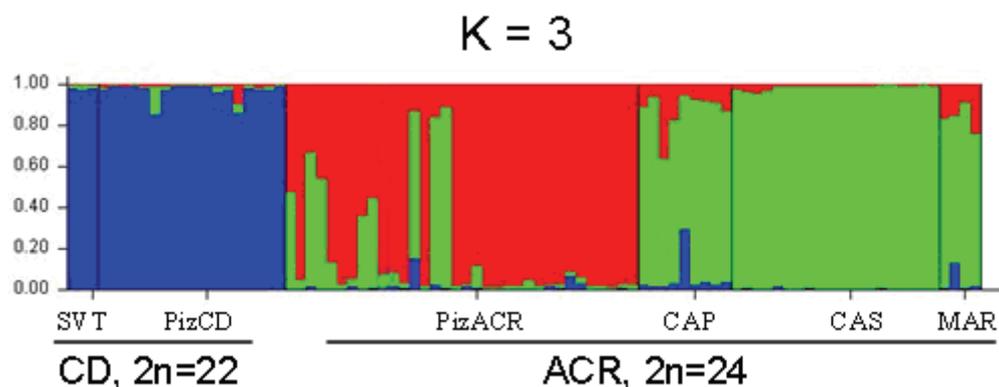
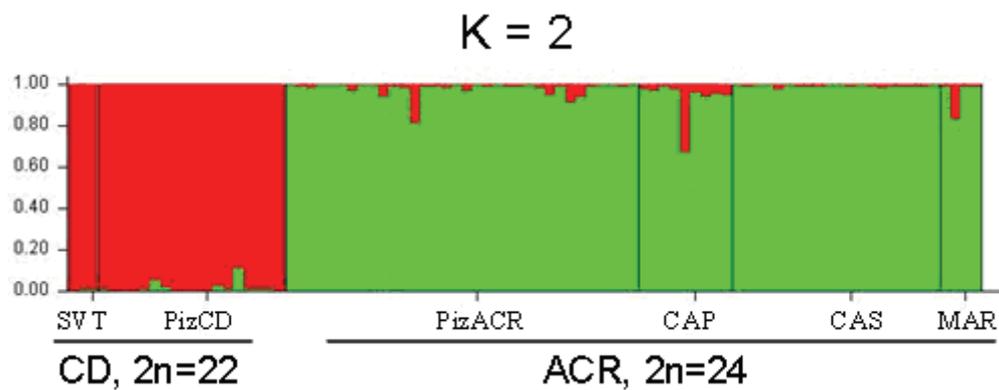
Nella figura 3.11 sono rappresentati dei grafici a barre che visualizzano i valori di Q associati a ciascun individuo ad ogni K ipotizzato. Come si vede dai diversi colori corrispondenti al numero di gruppi, la situazione con $K = 2$ è quella che "cattura" in modo più efficiente la struttura nei dati in esame. Questa separazione corrisponde alla separazione del campione nelle due razze cromosomiche.

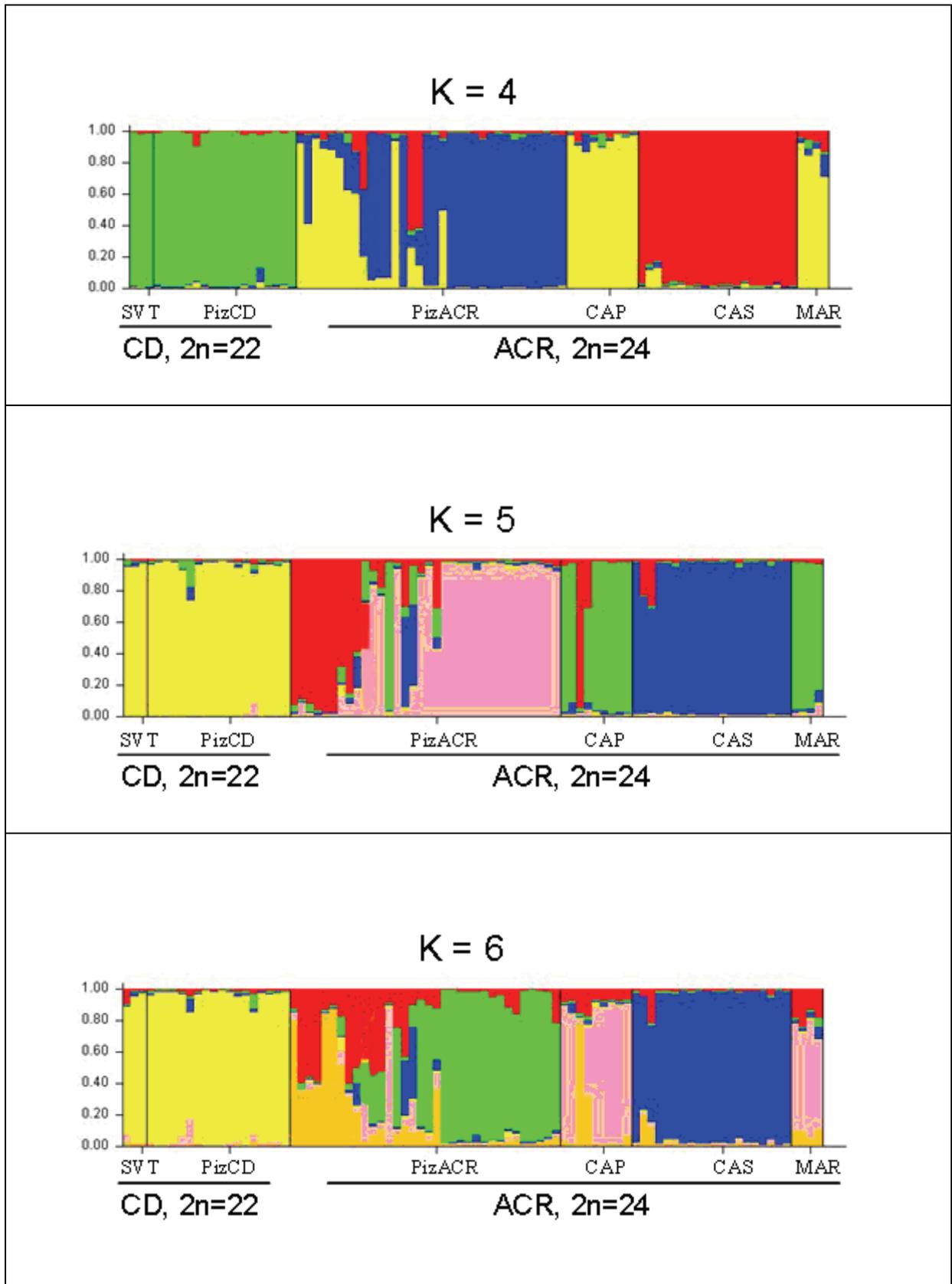
Analizzando i grafici corrispondenti a $K = 2, 3, 4, 5$ e 6 , è evidente come la separazione fra le razze cromosomiche rimanga costante, ma si manifesta una sottostruttura negli individui appartenenti alla razza ACR. Tale sottostruttura corrisponde solo in parte alla suddivisione del campione in popolazioni geografiche (ad eccezione della popolazione CAS, che ad ogni $K > 2$

presenta alti valori di Q relativi agli individui che la costituiscono, quindi risulta più separata dalle altre.

Figura 3.11 - Grafici di assegnazione dei singoli individui in base al genotipo secondo il modello *admixture* implementato nel programma “STRUCTURE 2.1”. Ogni individuo è rappresentato dalle barre verticali di colorazione proporzionale alla probabilità di appartenenza ad una delle K popolazioni ipotizzate (ognuna delle K popolazioni è rappresentata da un colore diverso). Le popolazioni geografiche sono indicate unicamente per individuare gli esemplari, in quanto nel *file input* sono stati inseriti solamente i genotipi degli individui senza specificarne la popolazione di appartenenza. E’ evidente una “struttura” ad ogni valore di K imposto.

Figure 3.11 - Assignment graphs based on the individual genotype built by “STRUCTURE 2.1” software through the admixture model. Each individual is represented by a single vertical bar broken in K colored segments, with lengths proportional to each of the K inferred clusters. The geographical populations are only shown to identify the individuals, since in the input file only the genotypes of individuals were inserted without the information of the origin population. The graphs show a clear “structure” at each given K .





3.3 - Morfometria geometrica

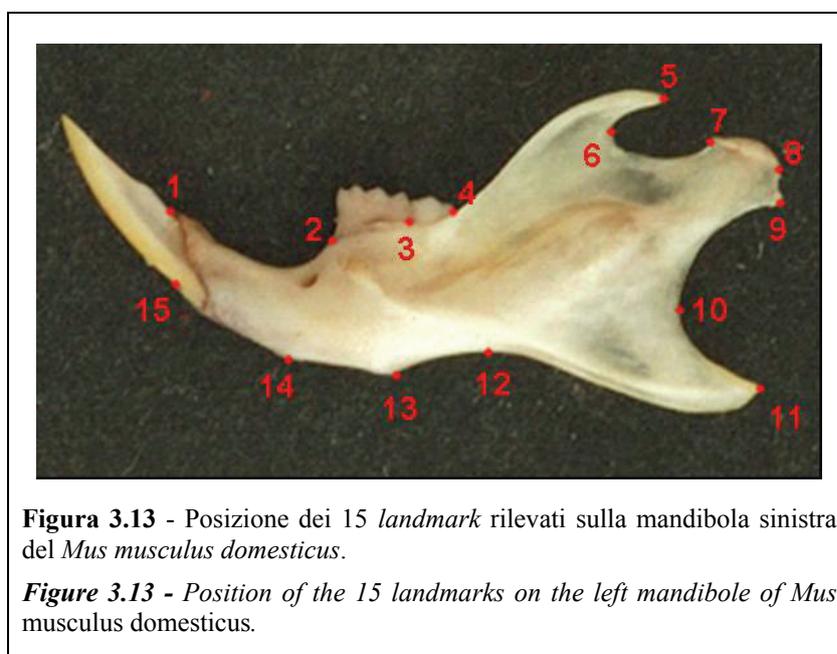
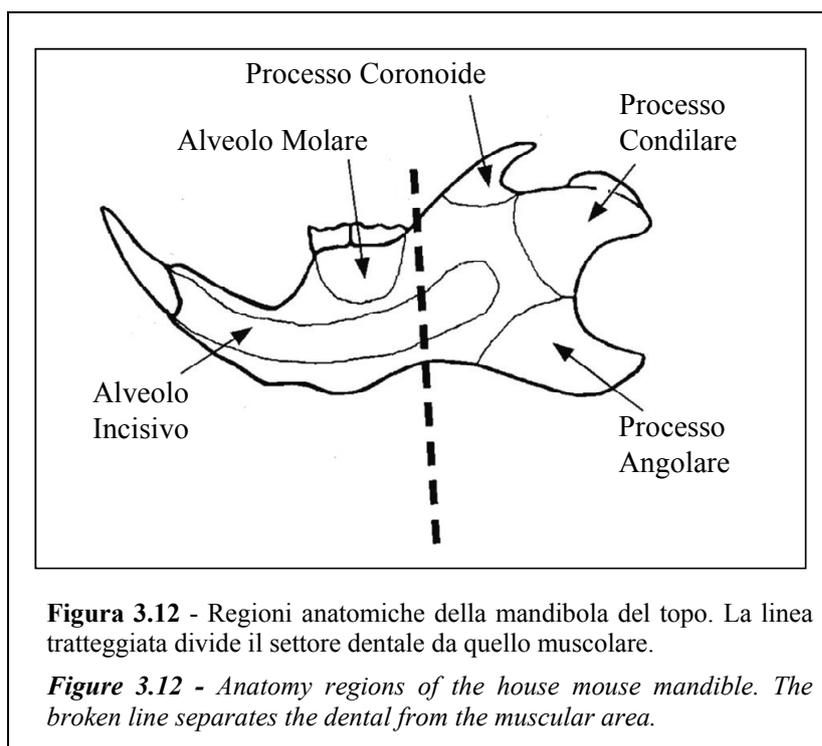
L'area di provenienza dei campioni sottoposti ad analisi morfometrica è riportata nelle cartine nelle figure 3.4 e 3.9. Le popolazioni sono le stesse utilizzate nell'analisi genetica, ma presentano delle variazioni a livello individuale. Esemplari usati esclusivamente nell'analisi genetica non sono presenti in quella morfologica a causa di perdita di materiale osseo durante la preparazione delle mandibole. Esemplari esclusivi dell'analisi morfometrica hanno presentato problemi nel corso dell'amplificazione o della genotipizzazione in almeno uno dei loci microsatelliti. E' stata aggiunta una popolazione con cariotipo standard proveniente dalla località di Anzio (ANZ - 41°29'10" N, 12°37'7" E), lontana dalle aree in esame e che vive in condizioni ecologiche diverse (macchia mediterranea).

Tutti gli individui sono adulti, questo ha evitato la suddivisione del campione in classi di età. La tabella completa degli esemplari utilizzati è mostrata nelle tabelle 2.4, 2.5 e 2.6 ed in Appendice B.

3.3.1 - Descrizione dei *landmark*

Sono stati individuati 15 *landmark* sulla regione labiale della mandibola sinistra, mostrati in figura 3.13 e descritti nella tabella 3.23. L'analisi della forma è stata condotta su 3 insiemi di dati diversi: il primo composto da tutti i *landmark*, il secondo dai 7 *landmark* del settore muscolare della mandibola e il terzo dagli 8 *landmark* di quello dentale (figure 3.12 e 3.13 , tabella 3.23). La suddivisione dei *landmark* nei due settori della mandibola è stata suggerita da una serie di studi basati su aspetti morfogenetici della mandibola del topo (Bailey 1986; Atchley e Hall, 1991; Leamy 1993; Klingenberg *et al.*, 2001; Muñoz-Muñoz *et al.*, 2006). Il settore dentale, dominato dall'alveolo incisivo, ha mostrato, in alcuni casi, una differente risposta ad analisi basate sui *quantitative trait loci* (QTL) e sull'asimmetria fluttuante rispetto al settore muscolare.

La suddetta divisione ha permesso di analizzare separatamente l'influenza di una componente genetica o di una componente ambientale sulle due regioni mandibolari.



Landmark	Regione anatomica	Settore
1	Alveolo incisivo	Dentale
2	Alveolo molare	Dentale
3	Alveolo molare	Dentale
4	Alveolo molare	Dentale
5	Processo coronoide	Muscolare
6	Processo coronoide	Muscolare
7	Processo condilare	Muscolare
8	Processo condilare	Muscolare
9	Processo condilare	Muscolare
10	Processo angolare	Muscolare
11	Processo angolare	Muscolare
12	Alveolo incisivo	Dentale
13	Alveolo incisivo	Dentale
14	Alveolo incisivo	Dentale
15	Alveolo incisivo	Dentale

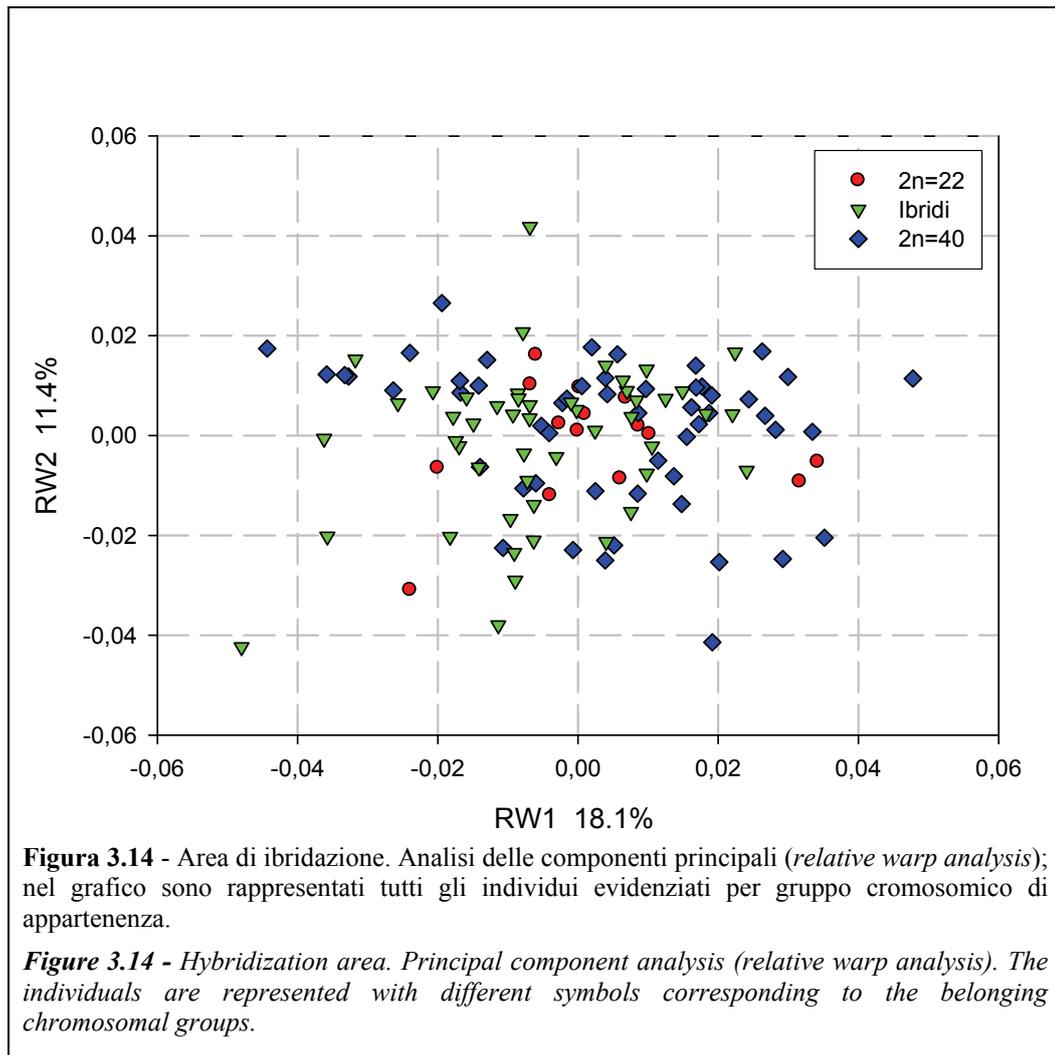
Tabella 3.23 - Descrizione dei *landmark*.
Table 3.23 - Landmarks description.

3.3.2 - Area di ibridazione: CD-Standard

3.3.2.1 - Conformazione: analisi dei *relative warp*

L'analisi dei componenti principali condotta sulla *weight matrix* di tutti i 117 esemplari dell'area di ibridazione non ha evidenziato una netta differenziazione morfologica fra i tre gruppi cromosomici in esame (CD 2n = 22, 2n = 40 e Ibridi). Tale assenza di differenziazione è rilevabile graficamente in figura 3.14, dove la coppia di vettori che descrive la maggior parte della variazione morfologica della forma (RW1, 18.1% e RW2, 11.4%) mostra gruppi scarsamente omogenei e poco distinguibili.

Nel grafico, gli individui appartenenti alle due razze cromosomiche e agli ibridi sono evidenziati con colori diversi.



3.3.2.2 - Conformazione: analisi multivariata della varianza

L'analisi multivariata della varianza (MANOVA) condotta sulle tre *weight matrix*, ovvero la matrice che descrive la forma di ogni individuo del campione, dei tre insiemi di dati in esame, ha evidenziato differenze significative fra gruppi cromosomici (CD 2n = 22, 2n = 40, Ibridi) solamente nel settore muscolare della mandibola. Sono risultate, invece, altamente significative le differenze di forma fra popolazioni nei tre distinti tipi di analisi. Non è emerso, in nessun caso, dimorfismo sessuale. La MANOVA è stata quindi utilizzata per esaminare le interazioni a coppie fra gli effetti "razza", "popolazione" e "sesso" e in nessuno dei tre insiemi di dati analizzati sono state evidenziate interazioni significative. In particolar modo, l'assenza

di interazione fra gli effetti “sesso” e “razza” e fra “sesso” e “popolazione” ha giustificato l’utilizzo dell’intero campione nell’analisi, senza separare i maschi dalle femmine.

Le tabelle che seguono mostrano i risultati della MANOVA (tabelle 3.24, 3.25 e 3.26).

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.462	52	1.38	0.0706
Popolazione	0.003	234	2.82	<.0001
Sesso	0.722	26	1.33	0.1637
Razza x Popolazione	0.306	104	1.02	0.4519
Razza x Sesso	0.612	52	0.92	0.6311
Popolazione x Sesso	0.065	234	1.02	0.4109

Tabella 3.24 - Area di ibridazione. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* di tutti i *landmark*.

Table 3.24 - Hybridization area. MANOVA performed on the *weight matrix* of all *landmarks*.

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.712	20	1.70	0.0363
Popolazione	0.155	90	2.22	<.0001
Sesso	0.869	10	1.52	0.1412
Razza x Popolazione	0.685	40	0.92	0.6149
Razza x Sesso	0.795	20	1.24	0.2256
Popolazione x Sesso	0.335	90	1.18	0.1373

Tabella 3.25 - Area di ibridazione. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* dei 7 *landmark* del settore muscolare.

Table 3.25 - Hybridization area. MANOVA performed on the *weight matrix* of the 7 *landmarks* of muscular area.

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.867	24	0.55	0.9567
Popolazione	0.137	108	1.93	<.0001
Sesso	0.927	12	0.66	0.7891
Razza x Popolazione	0.554	48	1.20	0.1790
Razza x Sesso	0.861	24	0.64	0.8989
Popolazione x Sesso	0.366	108	0.87	0.8057

Tabella 3.26 - Area di ibridazione. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* degli 8 *landmark* del settore dentale.

Table 3.26 - Hybridization area. MANOVA performed on the *weight matrix* of the 8 *landmarks* of dental area.

3.3.2.3 - Conformazione: analisi delle variate canoniche

Lo studio della forma fra razze cromosomiche e fra popolazioni sono state analizzate tramite un'analisi delle variate canoniche (CVA). Per quanto riguarda le differenze fra i gruppi cromosomici, essendo questi solamente tre (CD $2n = 22$, $2n = 40$, $2n =$ Ibridi), il 100% della variazione è espressa dalle due variate canoniche (CV1 e CV2). Come si può vedere dal relativo grafico di ordinamento (figura 3.15), le due razze cromosomiche e gli ibridi, evidenziate con colori diversi, formano dei gruppi scarsamente omogenei, ma, a differenza di quanto visualizzato dal grafico delle componenti principali, vi è un certo grado di separazione che permette di distinguerli.

L'analisi delle variate canoniche ha mostrato, inoltre, una separazione notevole anche fra le popolazioni geografiche (figura 3.17). Le prime due variate canoniche (CV1 e CV2), che descrivono una variazione cumulata del 51.0% della variazione totale, mostrano la maggior parte dei dieci gruppi ben distinguibili, soprattutto rispetto alla CV1 (35.5%).

In nessuna delle due variate canoniche è rilevabile una tendenza conforme alla distribuzione geografica delle popolazioni (vedi cartina in figura 3.4), mentre nel grafico delle variate canoniche dei gruppi cromosomici si evidenzia una certa congruenza tra morfologia e localizzazione geografica.

Nella figura 3.16 sono mostrate le griglie di deformazione relative ai valori negativi ($2n = 40$) e positivi (CD $2n = 22$) di CV1 relative all'analisi delle variate canoniche dei gruppi cromosomici. La variazione di forma è localizzata nel settore dentale della mandibola (contrazione in senso dorso-ventrale della parte mediana dell'alveolo incisivo, e quindi abbassamento dell'alveolo molare, e contrazione in senso longitudinale della parte infero-posteriore dell'alveolo incisivo negli individui con cariotipo $2n = 40$ rispetto agli altri due gruppi cromosomici) ed in quello muscolare (espansione della parte superiore, processo coronoide e condilare, negli individui $2n = 40$).

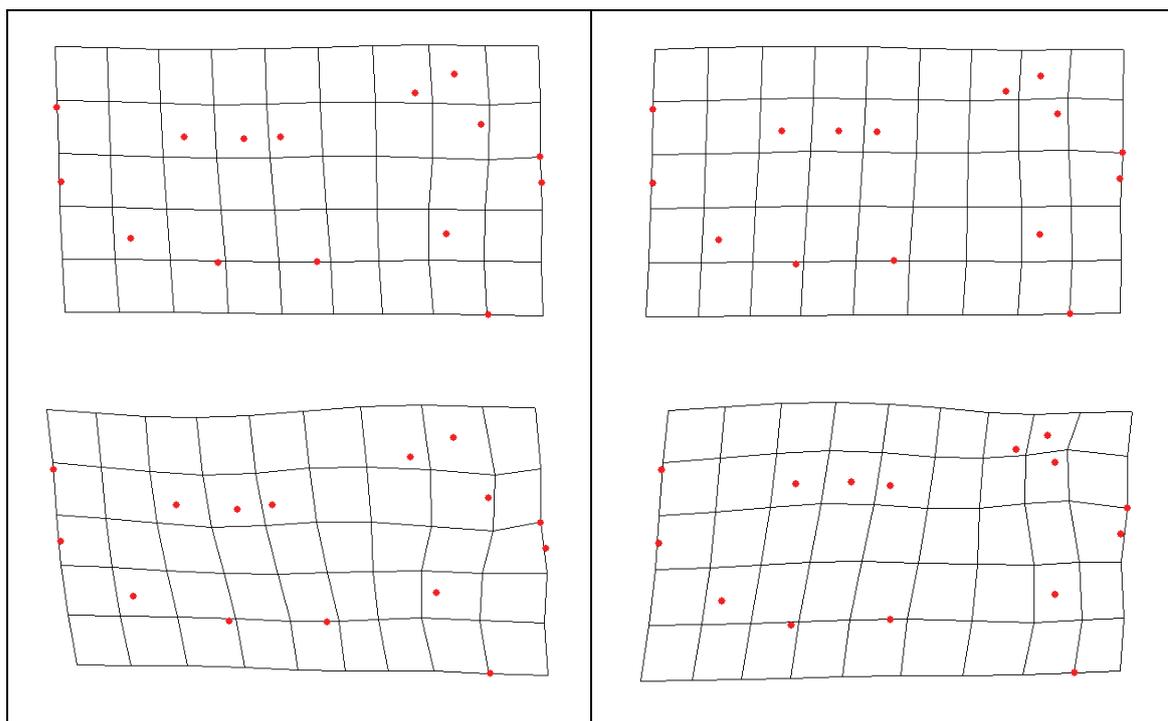
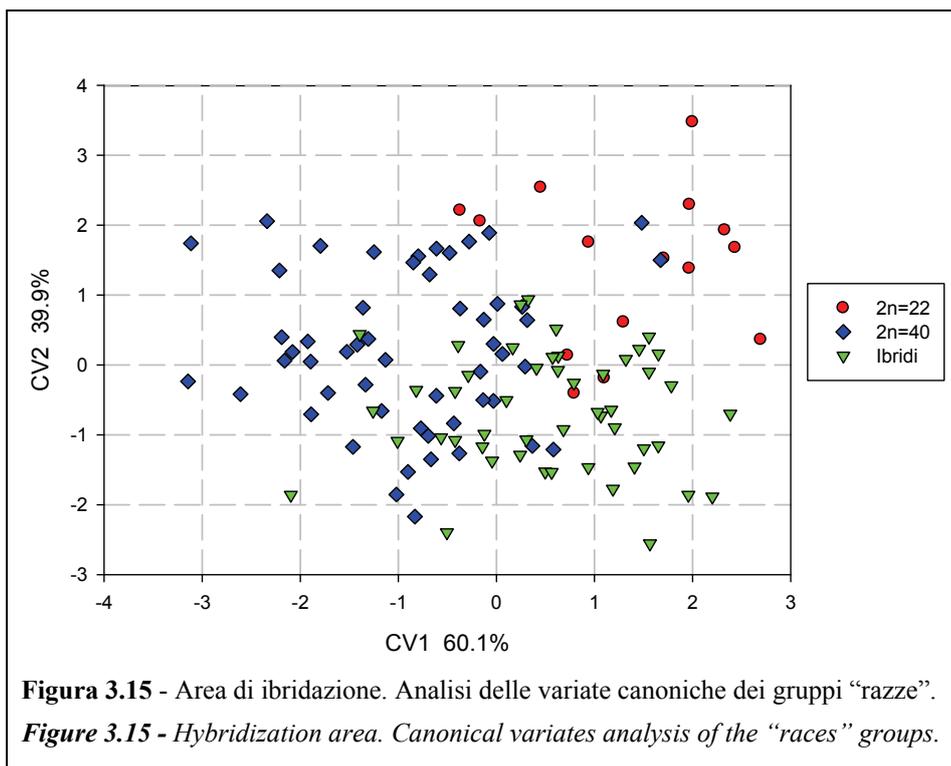
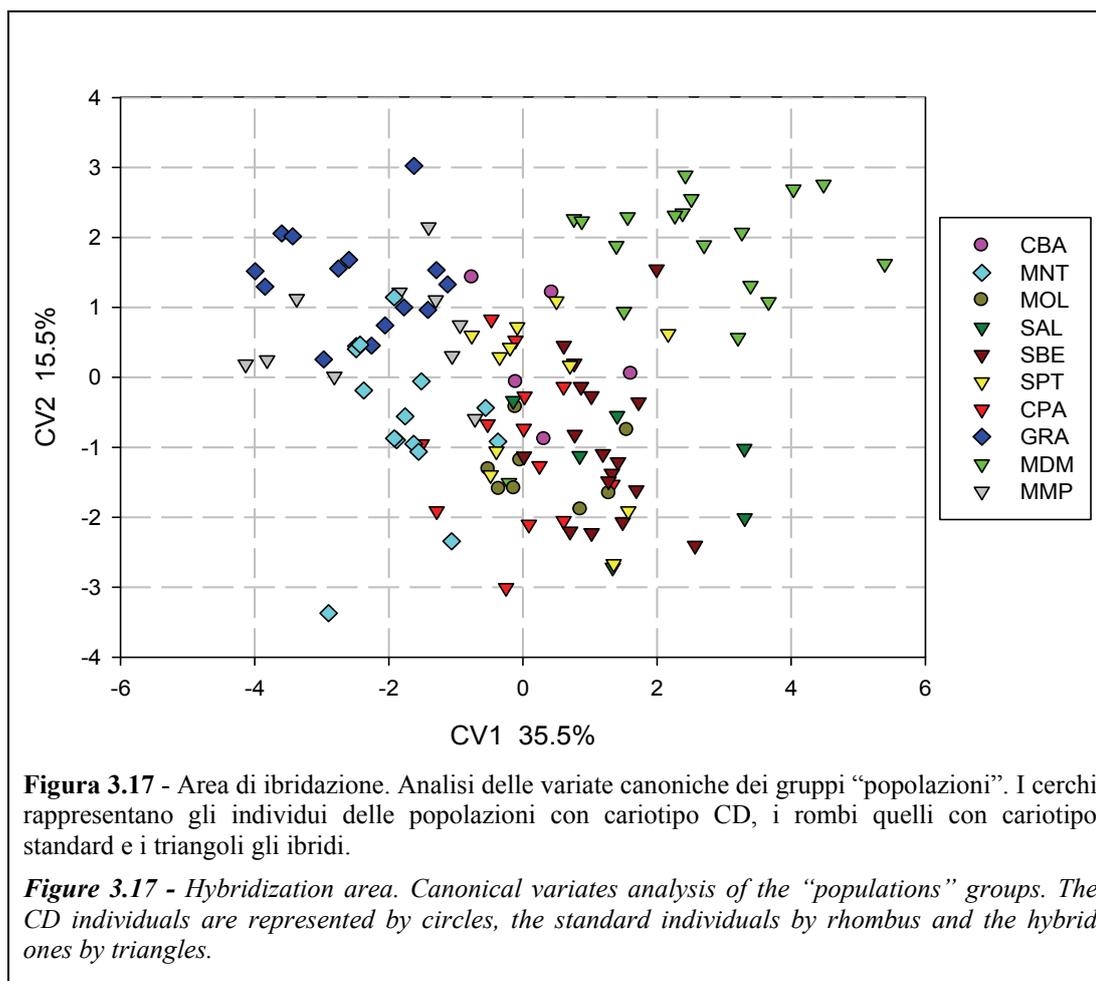


Figura 3.16 - Area di ibridazione. Griglie di deformazione: cambiamenti di conformazione relativi ai valori negativi ($2n = 40$), in alto a sinistra, e positivi ($CD\ 2n = 22$), in alto a destra, di CV1 (60.1% varianza). In basso sono mostrate le stesse griglie con un fattore di ingrandimento 3x per consentire una migliore visualizzazione della deformazione.

Figure 3.16 - Hybridization area. Deformation grids: conformational variations corresponding to the negative ($2n = 40$, left above) and positive values ($CD\ 2n = 22$, right above) of CV1 (variance: 60.1%). The same grids with a 3x magnification factor are shown below.



3.3.2.4 - Conformazione: analisi discriminante

Per ottenere informazioni sulla significatività delle differenze fra i tre gruppi cromosomici e fra le popolazioni, è stata condotta un’analisi discriminante basata sul *test* di Hotelling T^2 . In questo modo sono state saggiate le differenze a coppie fra i gruppi cromosomici e fra le popolazioni, espresse dalle distanze di Mahalanobis.

Il *test* effettuato sui gruppi cromosomici mostra come l’unica differenza di forma significativa è presente fra la razza CD $2n = 22$ e la razza a cariotipo standard (tabella 3.27). Questa differenza è evidenziata anche dalle griglie di deformazione relative alle due razze cromosomiche sull’asse CV1, descritta nel paragrafo precedente. Il *test* effettuato sulle popolazioni (tabella 3.28) mostra una differenza significativa nella maggior parte dei confronti

(30 confronti significativi su 45). Come evidenziato graficamente dalle variate canoniche, non c'è una netta correlazione fra differenze significative e gruppo cromosomico di appartenenza delle popolazioni.

I rapporti reciproci fra le popolazioni sono stati visualizzati tramite gli alberi di massima verosimiglianza calcolati in base alle *relative warp score matrix* dei tre insiemi di dati sui quali è stata condotta la MANOVA (mandibola completa, settore muscolare e settore dentale). Nei tre alberi non è evidente la separazione delle popolazioni nei tre gruppi cromosomici in esame (figura 3.19).

Le relazioni fra le popolazioni sono state, inoltre, analizzate tramite un *minimum spanning tree* (MST) condotto sulle distanze di Procuste fra le popolazioni stesse. Il MST (sovrapposto al grafico delle medie canoniche di figura 3.18) ha mostrato una stretta relazione fra le popolazioni a cariotipo interamente e prevalentemente a 40 cromosomi (GRA, MNT, MDM e MMP) mentre non ha evidenziato una netta separazione fra le popolazioni a 22 cromosomi e quelle costituite da individui ibridi.

	22	40	Ibridi
22	-		
40	0.0089	-	
Ibridi	0.0327	0.0211	-

Tabella 3.27 - Area di ibridazione. Analisi discriminante: valori di p del *test* di Hotelling T^2 effettuato sulle distanze di Mahalanobis. In grassetto sono evidenziate valori che indicano differenze significative fra i gruppi "razze" ($p < 0.0166$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.27 - Hybridization area. Discriminant analysis: *p-values* of the Hotelling T^2 test performed on the Mahalanobis distances. Significance differences between "races" groups are marked in bold ($p < 0.0166$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

	CBA	CPA	GRA	MDM	MMP	MNT	MOL	SAL	SBE	SPT
CBA	-									
CPA	0.0006	-								
GRA	<0.0001	<0.0001	-							
MDM	<0.0001	<0.0001	<0.0001	-						
MMP	0.0003	0.0003	0.0381	<0.0001	-					
MNT	<0.0001	0.0014	0.0031	<0.0001	0.0035	-				
MOL	<0.0001	0.0186	<0.0001	<0.0001	0.0003	0.0008	-			
SAL	0.0015	0.0049	<0.0001	0.0007	<0.0001	0.0003	0.0017	-		
SBE	0.0004	0.0032	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0071	0.1493	-	
SPT	<0.0001	0.0004	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0150	0.0061	0.1062	0.0252	-

Tabella 3.28 - Area di ibridazione. Analisi discriminante: valori di p del *test* di Hotelling T^2 effettuato sulle distanze di Mahalanobis. In grassetto sono evidenziate valori che indicano differenze significative fra popolazioni ($p < 0.0011$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.28 - Hybridization area. Discriminant analysis: *p*-values of the Hotelling T^2 test performed on the Mahalanobis distances. Significance differences between populations are marked in bold ($p < 0.0011$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

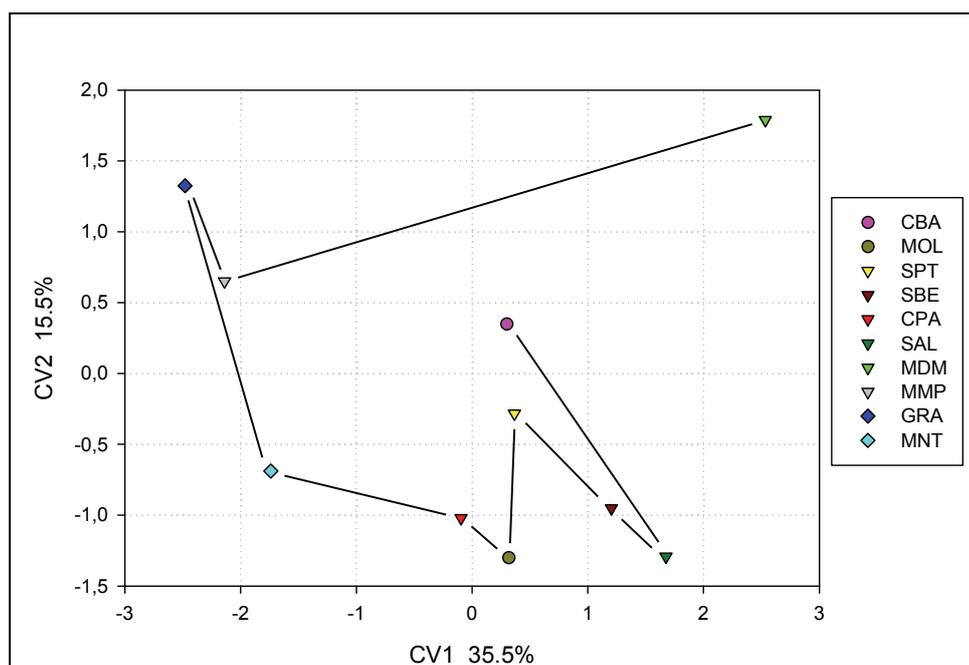


Figura 3.18 - Area di ibridazione. *Minimum spanning tree* costruito in base alle distanze di Procuste sovrapposto alle medie canoniche delle popolazioni. La legenda mostra, dall'alto verso il basso, le popolazioni in ordine di localizzazione geografica lungo il transetto di studio. I cerchi rappresentano le popolazioni a 22 cromosomi, i rombi quelle interamente a 40 cromosomi e i triangoli le popolazioni ibride.

Figure 3.18 - Hybridization area. *Minimum spanning tree* based on Procuste distances superimposed to the canonical means of the populations. The legend shows the populations as they are located along the study transept. The $2n = 22$ populations are represented by circles, the entirely standard populations by rhombus and the hybrid ones by triangles.

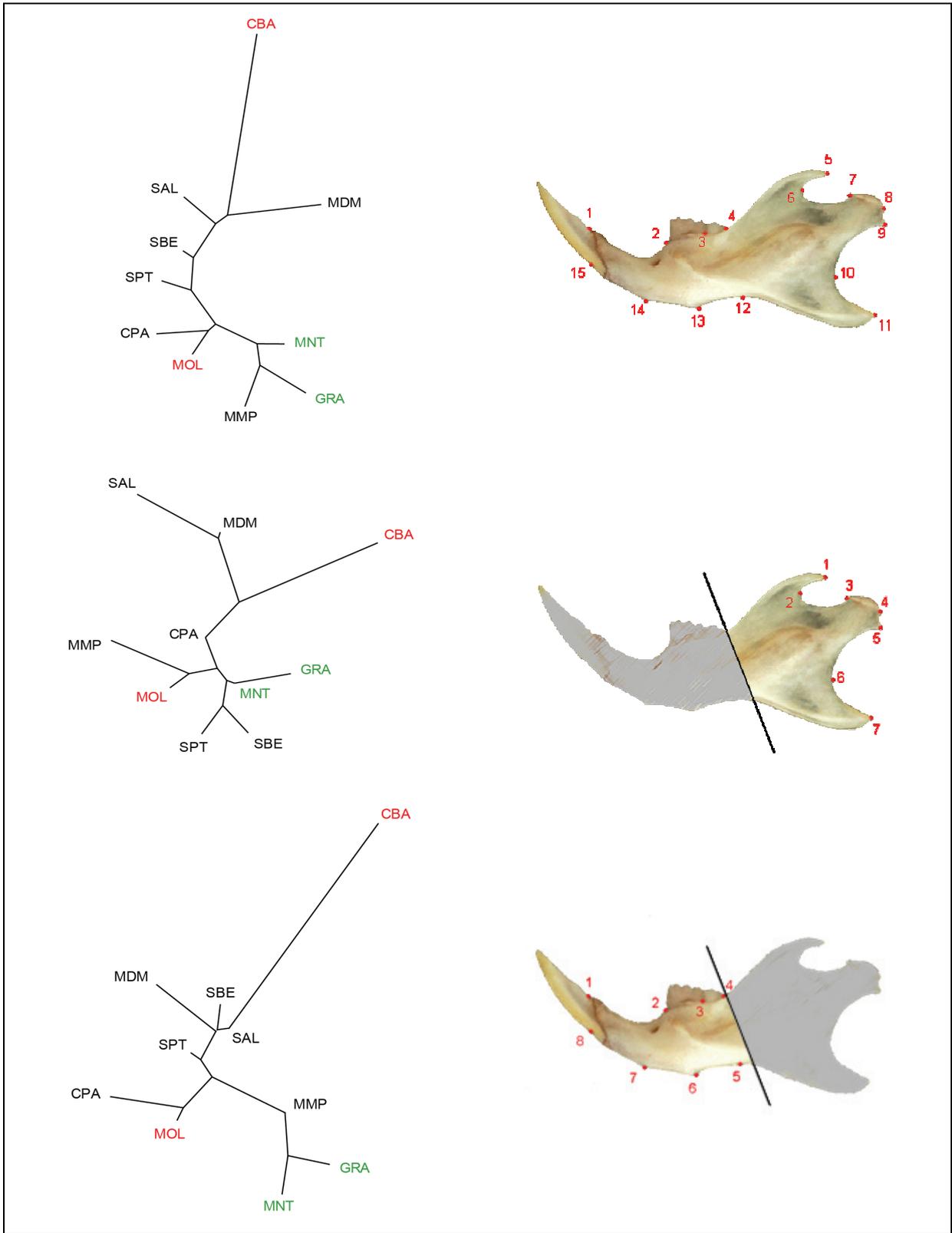


Figura 3.19 - Area di ibridazione. Alberi di massima verosimiglianza dei 3 gruppi di *landmark* costruiti in base alla *relativa warp score matrix* delle configurazioni di consenso delle “popolazioni”. Le sigle delle popolazioni sono colorate secondo i gruppi cromosomici di appartenenza: $2n = 22$ (CD) rosso, $2n = 40$ verde e ibridi nero.

Figure 3.19 - Hybridization area. Maximum likelihood trees of the 3 landmarks groups based on the relative warp score matrix of the “populations” consensus configurations. The CD ($2n = 22$), standard ($2n = 40$) and hybrid populations are respectively red, green and black highlighted.

3.3.2.5 - Taglia: analisi univariata della varianza

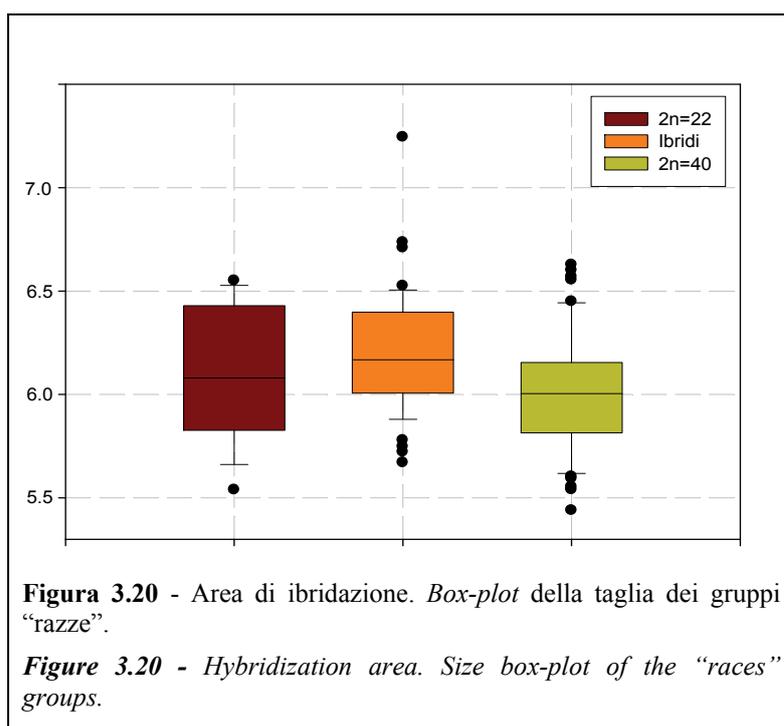
Per verificare la presenza di variazione nella taglia è stata condotta un'analisi univariata della varianza (ANOVA) del *centroid size* calcolato per ogni esemplare. Sono state riscontrate differenze significative fra gruppi cromosomici, fra popolazioni e fra sessi. Le interazioni fra i tre effetti sono risultati comunque non significativi. I risultati dell'ANOVA sono mostrati nella tabella 3.29.

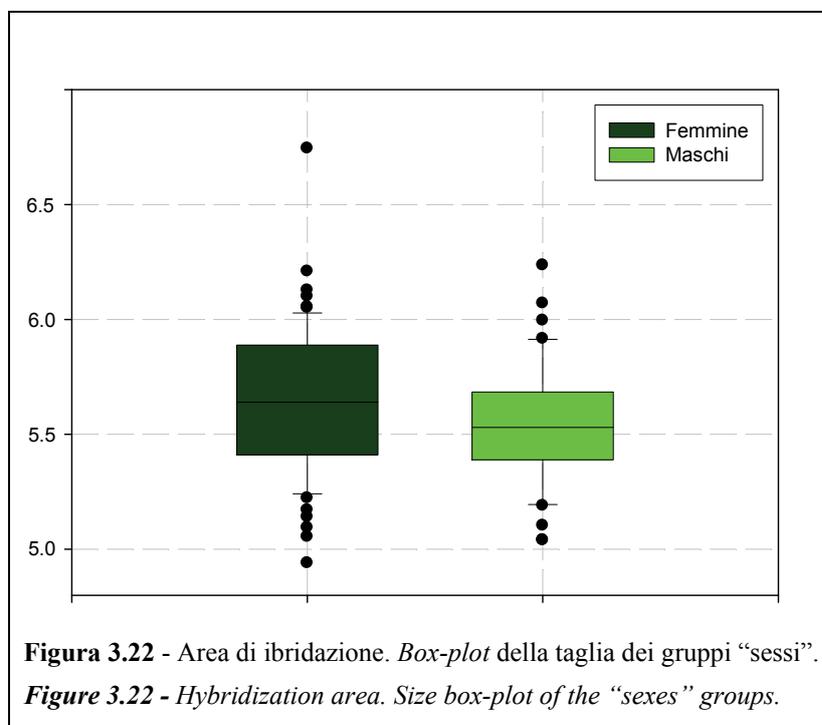
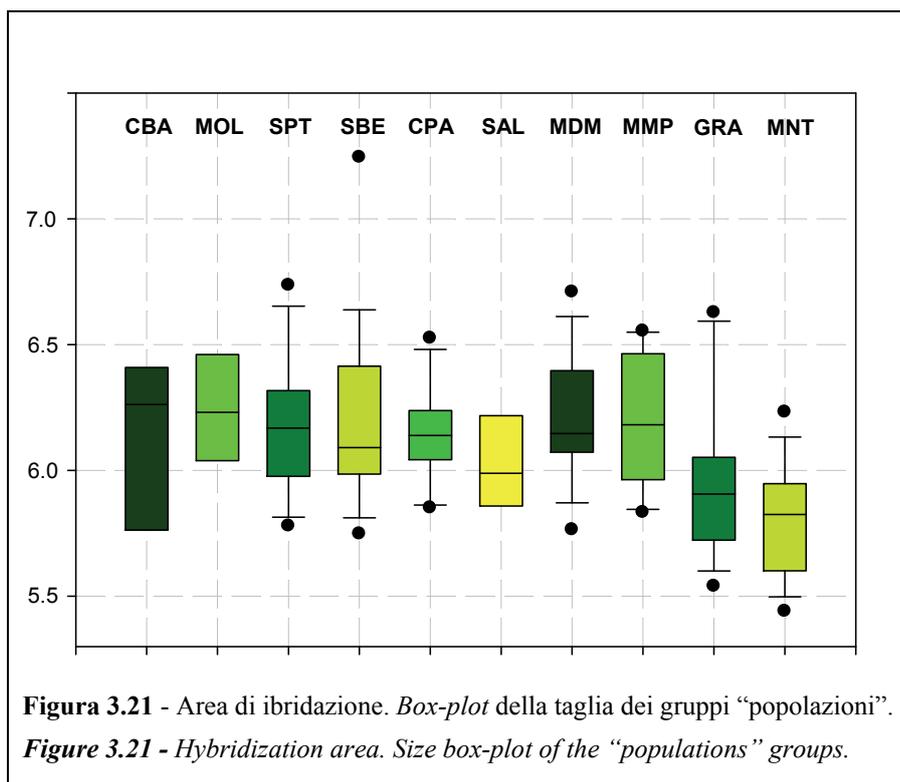
La dispersione dei valori del *centroid size* è stata visualizzata tramite tre distinti *box-plot* relativi ai 3 gruppi cromosomici, alle 10 popolazioni e ai sessi. La dispersione dei valori intorno alla media mette in evidenza lievi differenze fra gli effetti studiati (figure 3.20, 3.21 e 3.22).

Effetto	gl	F	p
Razza	2	6.51	0.0030
Popolazione	9	3.50	0.0008
Sesso	1	5.38	0.0224
Razza x Popolazione	4	0.00	1.0000
Razza x Sesso	2	1.97	0.1443
Popolazione x Sesso	9	1.33	0.2328

Tabella 3.29 - Area di ibridazione. Risultati dell'ANOVA condotta sul *centroid size* della mandibola.

Table 3.29 - Hybridization area. ANOVA performed on the mandible *centroid size*.





3.3.2.6 - Taglia: *test T di Student*

Per verificare la presenza di differenze significative all'interno dei gruppi cromosomici e delle popolazioni è stato condotto un *test T di Student* sulle medie dei *centroid size* dei due effetti. Per quanto riguarda i gruppi cromosomici, è risultata significativa solamente la differenza di taglia fra gli individui con cariotipo standard ($2n = 40$) e gli ibridi (gli individui con cariotipo $2n = 40$ sono risultati mediamente più piccoli rispetto agli ibridi), mentre in nessuno dei confronti fra le dieci popolazioni in esame è stata riscontrata significatività ($p < 0.0011$ in tutti i confronti, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

La differenza di taglia osservata fra i sessi mette in evidenza una dimensione maggiore delle femmine rispetto ai maschi.

	22	40	Ibridi
22	-		
40	NS	-	
Ibridi	NS	***	-

Tabella 3.30 - Area di ibridazione. Analisi discriminante: *test T di Student* effettuato sulle medie del *centroid size* dei gruppi “ $2n = 22$ ”, “ $2n = 40$ ” ed “ibridi”. Gli asterischi indicano differenze significative ($p < 0.0166$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.30 - Hybridization area. Discriminant analysis: Student's *T-test* performed on the centroid size means of the “ $2n = 22$ ”, “ $2n = 40$ ” and “hybrids” groups. Significance differences are indicated by asterisks ($p < 0.0166$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

3.3.2.7 - Correlazione fra variazione morfologica ed ambientale

Per stimare l'influenza della variabilità ambientale sulla variazione di forma è stata eseguita un'analisi dei minimi quadrati parziali (PLS: Rohlf e Corti, 2000) fra la *weight matrix* e un'insieme di variabili geografiche: latitudine, longitudine ed altitudine. Per quanto riguarda

la taglia è stata eseguita una regressione semplice fra il *centroid size* e le stesse variabili geografiche. Entrambe le analisi sono state condotte sui descrittori della forma e della taglia dei singoli individui.

Il PLS ha evidenziato l'esistenza di una correlazione bassa, ma significativa, fra i tre insiemi di vettori. Il primo vettore della forma e il primo vettore delle variabili descrivono gran parte della covarianza totale, 84.6% (tabella 3.31). L'analisi dei singoli vettori delle variabili (tabella 3.32) ha mostrato un modello di variazione geografica influenzato dalla latitudine ($r = 0.75$) e dalla longitudine ($r = 0.74$) per quanto riguarda il primo dei tre vettori, mentre il secondo e terzo vettore delle variabili hanno presentato una variazione dovuta in massima parte ad un gradiente latitudinale sud-nord e altitudinale (secondo vettore).. La correlazione fra il primo vettore della forma e il primo vettore delle variabili è mostrato in figura 3.23, dove si evidenzia il gradiente latitudinale.

L'analisi della taglia ha evidenziato assenza di correlazione fra il *centroid size* e la latitudine ($p = 0.069$), ma al limite della significatività, mentre sono risultate significative le correlazioni fra taglia e longitudine ($p < 0.001$) e fra taglia ed altitudine ($p < 0.001$). Data la particolare struttura dell'area di ibridazione, gli individui più grandi sembrano essere localizzati più ad est rispetto al resto del campione e ad altitudini maggiori. Gli individui localizzati più ad ovest, più piccoli, si trovano ad altitudini minori.

Vettori	Covarianza	Varianza (%)	Varianza cumulativa (%)	r
1	0.0111	84.6138	84.6138	0.52515
2	0.0041	11.3728	95.9866	0.44714
3	0.0024	4.0134	100.0000	0.46256

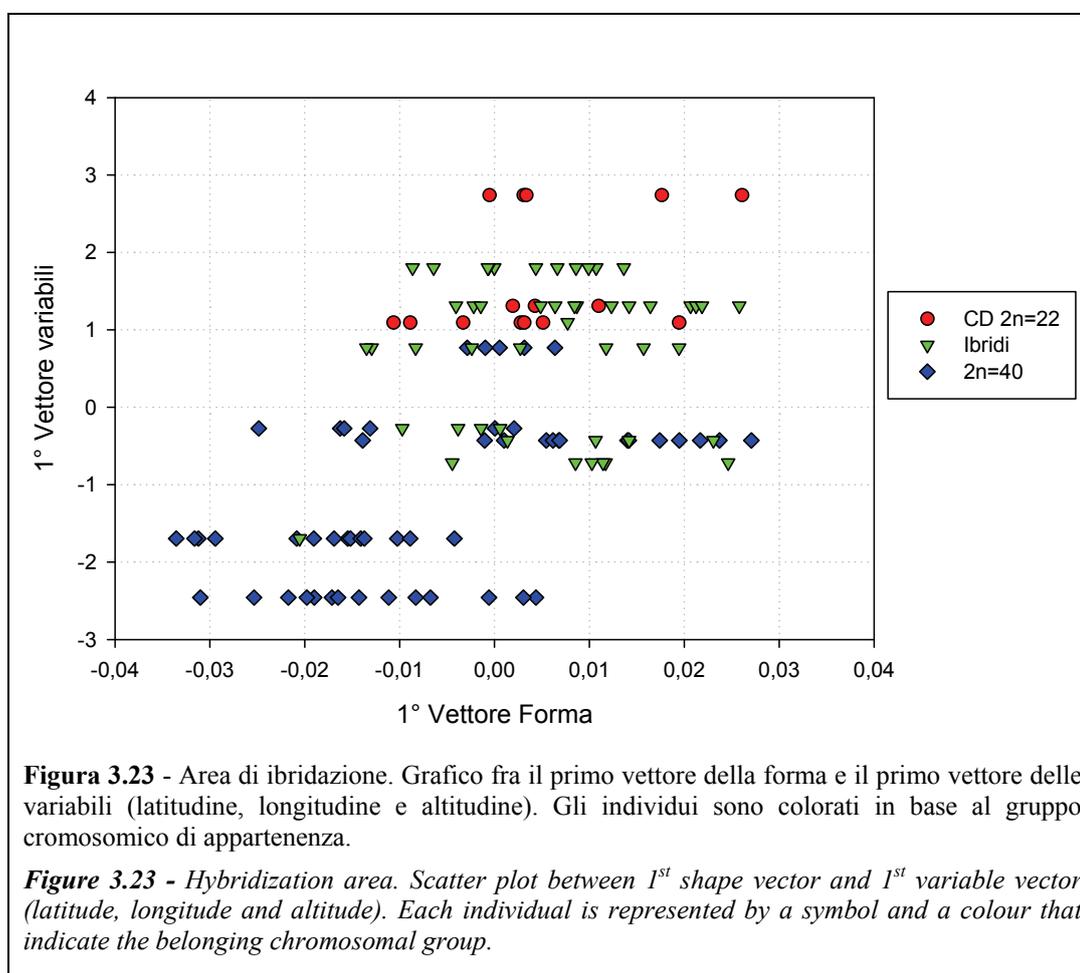
Tabella 3.31 - Area di ibridazione. Covarianza, percentuale di variazione, spiegata e cumulativa, e indice di correlazione fra gli insiemi di vettori. In grassetto sono evidenziate correlazioni significative.

Table 3.31 - Hybridization area. Covariation, explained and cumulative variation percentage and correlation index between vectors sets. Significance correlations are marked in bold.

Vettori variabili	Variabili originali		
	Latitudine	Longitudine	Altitudine
1	0.75154	0.74251	0.13418
2	0.85582	-0.32266	0.72809
3	0.96736	0.03795	0.20258

Tabella 3.32 - Area di ibridazione. Correlazione fra le variabili originali ed i vettori delle variabili.

Table 3.32 - Hybridization area. Correlation between original variables and variable vectors.

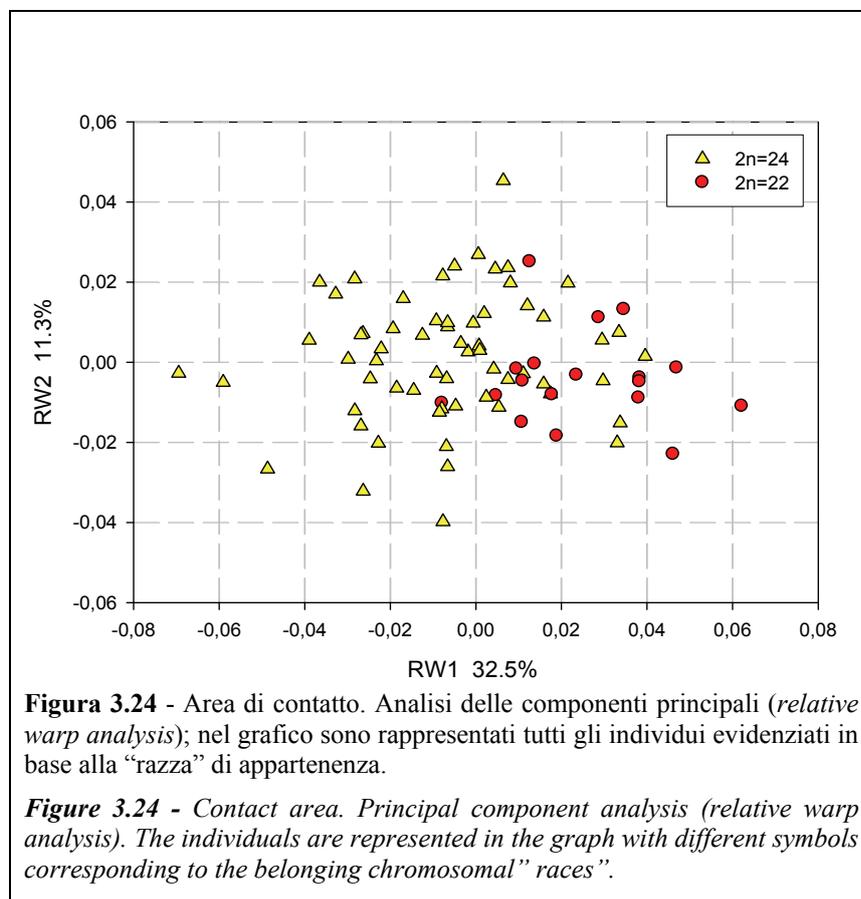


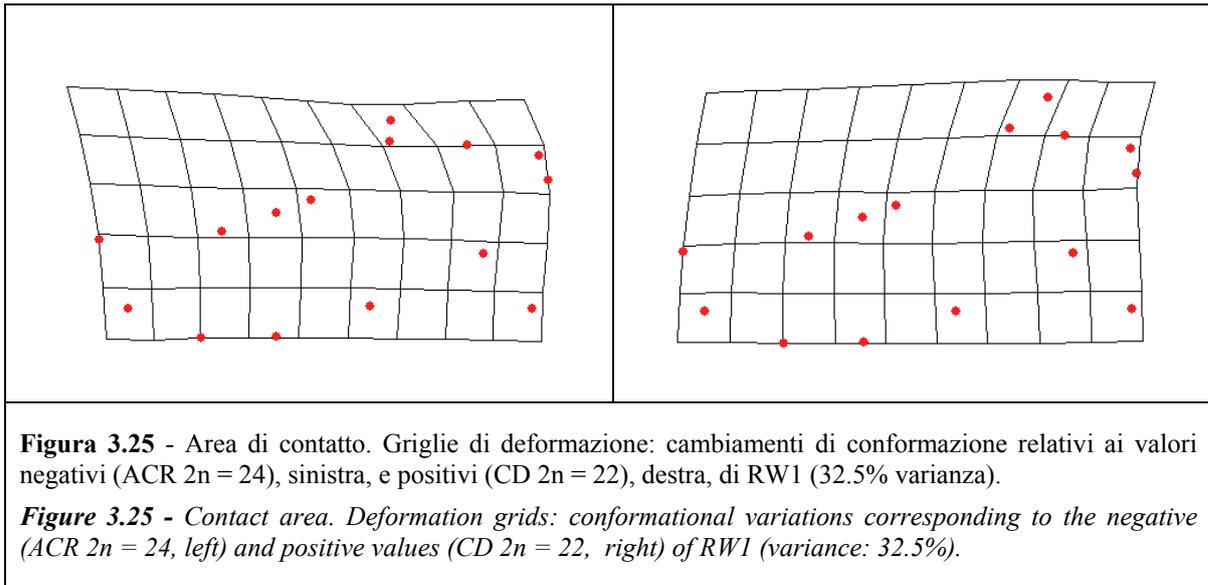
3.3.3 - Area di contatto: CD-ACR

3.3.3.1 - Conformazione: analisi dei *relative warp*

L'analisi dei componenti principali condotta sulla *weight matrix* di tutti gli 81 esemplari dell'area di contatto ha evidenziato una notevole differenziazione morfologica fra le due razze cromosomiche in esame. Tale variazione è rilevabile graficamente soprattutto sul 1° vettore (RW1, 32.5%) che descrive la maggior parte della variazione morfologica, dove i gruppi sono distinguibili, anche se non molto omogenei. Nel grafico, gli individui corrispondenti alle due razze cromosomiche sono evidenziati con colori diversi (figura 3.24).

Inoltre, la variazione di forma fra le due razze cromosomiche è evidenziata dalle griglie di deformazione in figura 3.25. Valori positivi (razza CD $2n = 22$) di RW1, l'unico asse dove gli individui appartenenti alle due razze mostrano una separazione netta, mostrano un arretramento del processo coronide rispetto ai valori negativi (razza ACR $2n = 24$). Gli individui ACR, inoltre, presentano un'espansione in senso dorso-ventrale a livello dell'estremità anteriore dell'alveolo incisivo.





3.3.3.2 - Conformazione: analisi multivariata della varianza

L'analisi multivariata della varianza (MANOVA) condotta sulle 3 *weight matrix*, ovvero la matrice che descrive la forma di ogni individuo del campione, dei 3 insiemi di dati in esame, ha evidenziato differenze significative fra gruppi cromosomici (CD 2n = 22 e ACR 2n = 24) e fra popolazioni geografiche. Non è emerso, inoltre, un effetto che indica un significativo dimorfismo sessuale.

La MANOVA è stata quindi utilizzata per esaminare le interazioni a coppie fra gli effetti "razza", "popolazione" e "sesso". Le interazioni fra razza e sesso e fra popolazione e sesso sono risultate non significative, giustificando l'utilizzo dell'intero campione nell'analisi, senza separare i maschi dalle femmine. L'interazione fra gli effetti razza e popolazione si è rivelata, invece, significativa, effetto dovuto alla marcata differenza morfologica fra le popolazioni della razza CD e quelle della razza ACR.

Le tabelle che seguono mostrano i risultati della MANOVA (tabelle 3.33, 3.34 e 3.35).

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.384	26	3.20	0.0002
Popolazione	0.068	104	1.86	<.0001
Sesso	0.629	26	1.18	0.3008
Razza x Popolazione	0.027	130	2.07	<.0001
Razza x Sesso	0.758	26	0.64	0.8934
Popolazione x Sesso	0.157	104	1.03	0.4210

Tabella 3.33 - Area di contatto. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* di tutti i *landmark*.

Table 3.33 - Contact area. MANOVA performed on the *weight matrix* of all landmarks.

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.690	10	3.04	0.0031
Popolazione	0.230	50	2.14	<.0001
Sesso	0.901	10	0.74	0.6831
Razza x Popolazione	0.258	50	2.10	<.0001
Razza x Sesso	0.871	10	1.00	0.4540
Popolazione x Sesso	0.541	40	1.02	0.4400

Tabella 3.34 - Area di contatto. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* dei 7 *landmark* del settore muscolare.

Table 3.34 - Contact area. MANOVA performed on the *weight matrix* of the 7 landmarks of muscular area.

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.555	12	4.39	<.0001
Popolazione	0.113	60	2.76	<.0001
Sesso	0.838	12	1.06	0.4073
Razza x Popolazione	0.143	60	2.60	<.0001
Razza x Sesso	0.876	12	0.77	0.6764
Popolazione x Sesso	0.432	48	1.16	0.2332

Tabella 3.35 - Area di contatto. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* degli 8 *landmark* del settore dentale.

Table 3.35 - Contact area. MANOVA performed on the *weight matrix* of the 8 landmarks of dental area.

3.3.3.3 - Conformazione: analisi delle variate canoniche

Lo studio della forma fra razze cromosomiche e fra popolazioni sono state visualizzate tramite un'analisi delle variate canoniche (CVA). Per quanto riguarda le differenze fra le razze, essendo queste solamente due, il 100% della variazione è espressa da una sola variata canonica (CV1). Come si può vedere dal relativo grafico di ordinamento (figura 3.26), le due razze cromosomiche, evidenziate con colori diversi, formano dei gruppi abbastanza omogenei e distinguibili fra di loro. Le griglie di deformazione relative a CV1 (figura 3.27) confermano la differenza conformazionale osservata in RW1 (arretramento del processo coronoide negli individui appartenenti alla razza CD, valori positivi di CV1, rispetto a quelli appartenenti alla razza ACR, valori negativi di CV1). Si evidenzia, inoltre, una variazione a carico della regione dell'alveolo molare (contrazione in senso longitudinale negli individui con cariotipo CD) e di quella dell'alveolo incisivo (espansione in senso dorso-ventrale dell'estremità anteriore negli individui con cariotipo ACR).

L'analisi delle variate canoniche ha mostrato, inoltre, una separazione notevole anche fra le popolazioni geografiche. Le prime due variate canoniche (CV1 e CV2), che descrivono una variazione cumulata del 66.3% della variazione totale, mostrano gruppi in alcuni casi abbastanza omogenei e distinguibili (figura 3.28). Da notare come le popolazioni appartenenti alla razza CD (SVT e PizCD) si distinguano in modo notevole, soprattutto sull'asse delle ascisse, corrispondente alla CV1 (40.5% della variazione totale), da quelle appartenenti alla razza ACR (CAP, CAS, MAR e PizACR)

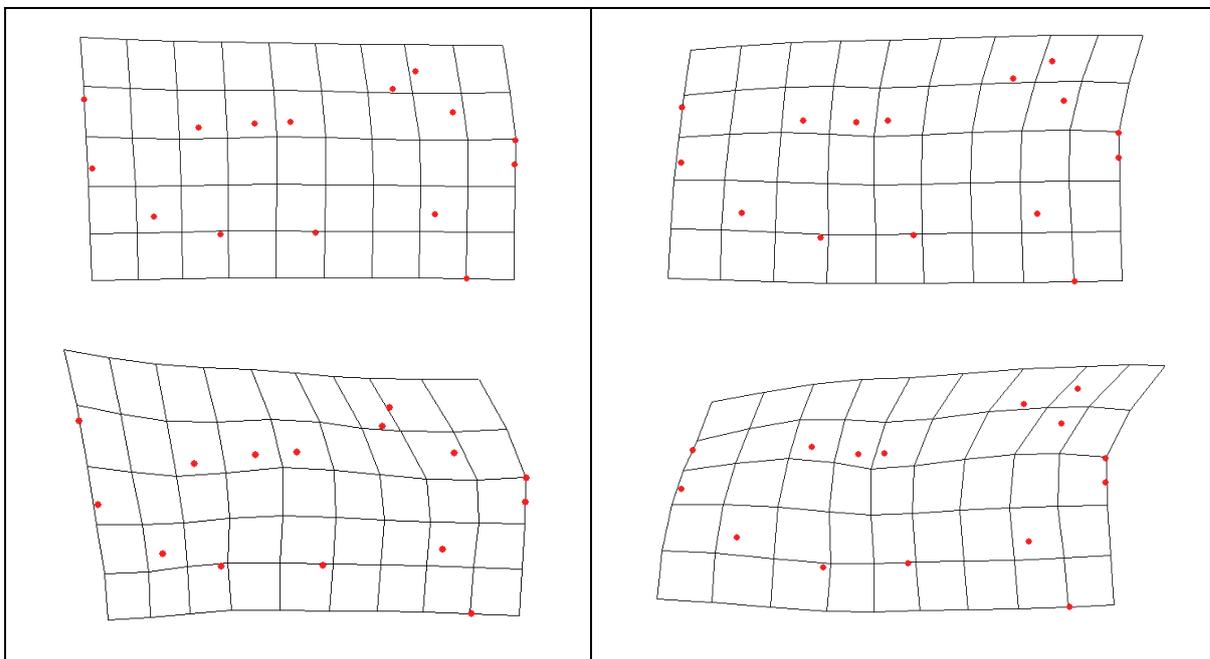
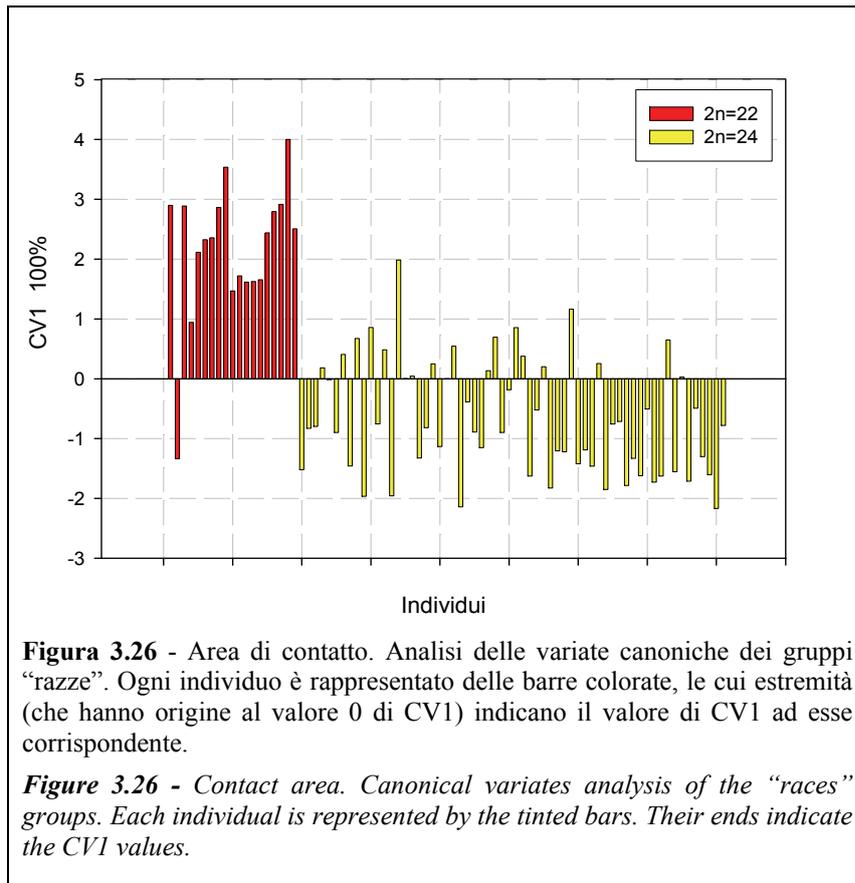
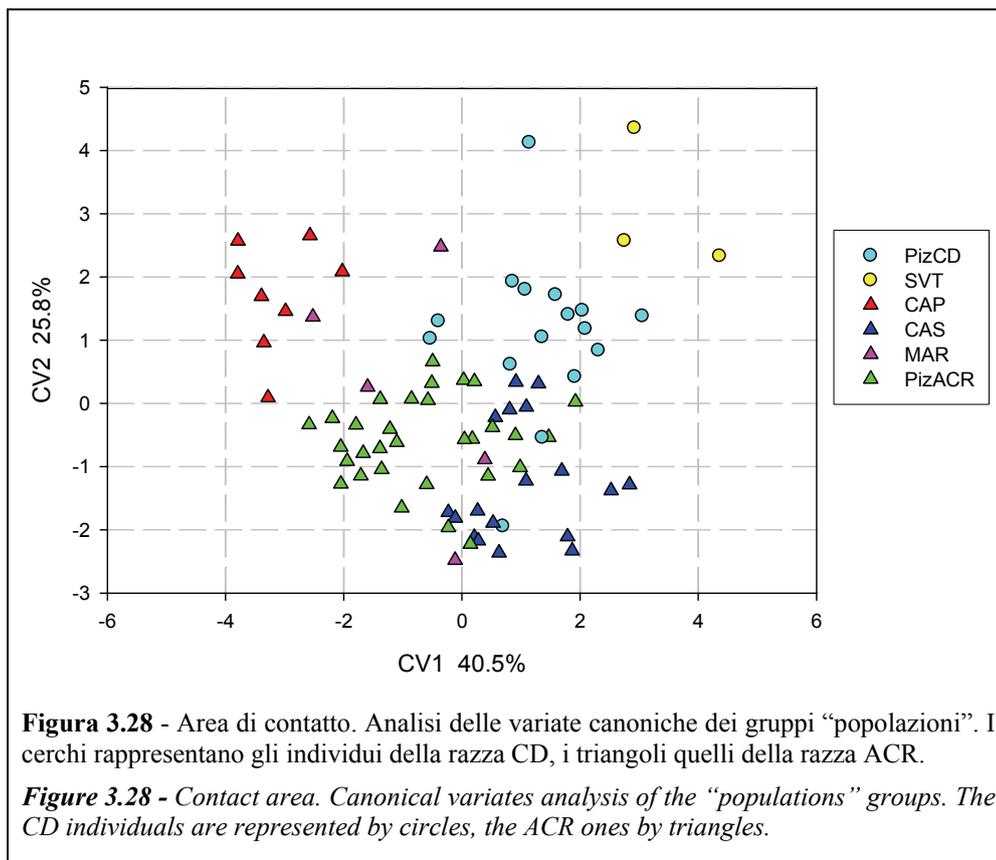


Figura 3.27 - Area di contatto. Griglie di deformazione: cambiamenti di conformazione relativi ai valori negativi (ACR $2n = 24$), in alto a sinistra, e positivi (CD $2n = 22$), in alto a destra, di CV1 (100% varianza). In basso sono mostrate le stesse griglie con un fattore di ingrandimento 3x per consentire una migliore visualizzazione della deformazione.

Figure 3.27 - Contact area. Deformation grids: conformational variations corresponding to the negative (ACR $2n = 24$, left above) and positive values (CD $2n = 22$, right above) of CV1 (variance: 100%). The same grids with a 3x magnification factor are shown below.



3.3.3.4 - Conformazione: analisi discriminante

Per ottenere delle informazioni sulla significatività delle differenze fra popolazioni, è stata condotta un'analisi discriminante basata sul *test* di Hotelling T^2 . In questo modo sono state saggiate le differenze a coppie fra le popolazioni, espresse dalle distanze di Mahalanobis.

I risultati del *test* (tabella 3.36) mostrano come le due popolazioni a 22 cromosomi, SVT e PizCD (razza CD) non sono significativamente differenti fra loro, ma presentano differenze significative con due popolazioni a 24 cromosomi, CAP e PizACR (razza ACR). MAR non presenta differenze significative con nessuna delle altre popolazioni, mentre CAS è diversa solo da CAP, quest'ultima morfologicamente separata dalle altre. Da notare come le due popolazioni PizCD e PizACR siano significativamente differenti, nonostante la breve distanza geografica che le separa (vedi cartina in figura 3.9).

	CAP	CAS	MAR	PizACR	PizCD	SVT
CAP	-					
CAS	<.0001	-				
MAR	0.0932	0.1068	-			
PIZACR	0.0013	0.0085	0.5955	-		
PIZCD	0.0001	0.0170	0.2098	0.0030	-	
SVT	0.0004	0.0075	0.0191	0.0023	0.1125	-

Tabella 3.36 - Area di contatto. Analisi discriminante: valori di p del *test* di Hotelling T^2 effettuato sulle distanze di Mahalanobis. In grassetto sono evidenziate valori che indicano differenze significative fra popolazioni ($p < 0.0033$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.36 - Contact area. Discriminant analysis: *p*-values of the Hotelling T^2 test performed on the Mahalanobis distances. Significance differences between populations are marked in bold ($p < 0.0033$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

I rapporti reciproci fra le popolazioni sono stati visualizzati tramite gli alberi di massima verosimiglianza calcolati in base alle *relative warp score matrix* dei tre insiemi di *landmark* sui quali è stata condotta la MANOVA (mandibola completa, settore muscolare e settore dentale). Nei tre alberi è evidente la separazione fra le due razze cromosomiche (figura 3.29).

Le relazioni fra le popolazioni sono state, inoltre, analizzate tramite un *minimum spanning tree* (MST) condotto sulle distanze di Procuste fra le popolazioni stesse. Il MST (sovrapposto al grafico delle medie canoniche di figura 3.30) ha mostrato una evidente connessione fra le popolazioni con cariotipo $2n = 22$ e quelle con cariotipo ACR. Da notare come la popolazione PizCD ($2n = 22$) non sia direttamente connessa a PizACR ($2n = 24$) nonostante la stretta relazione geografica (vedi cartina in figura 3.9).

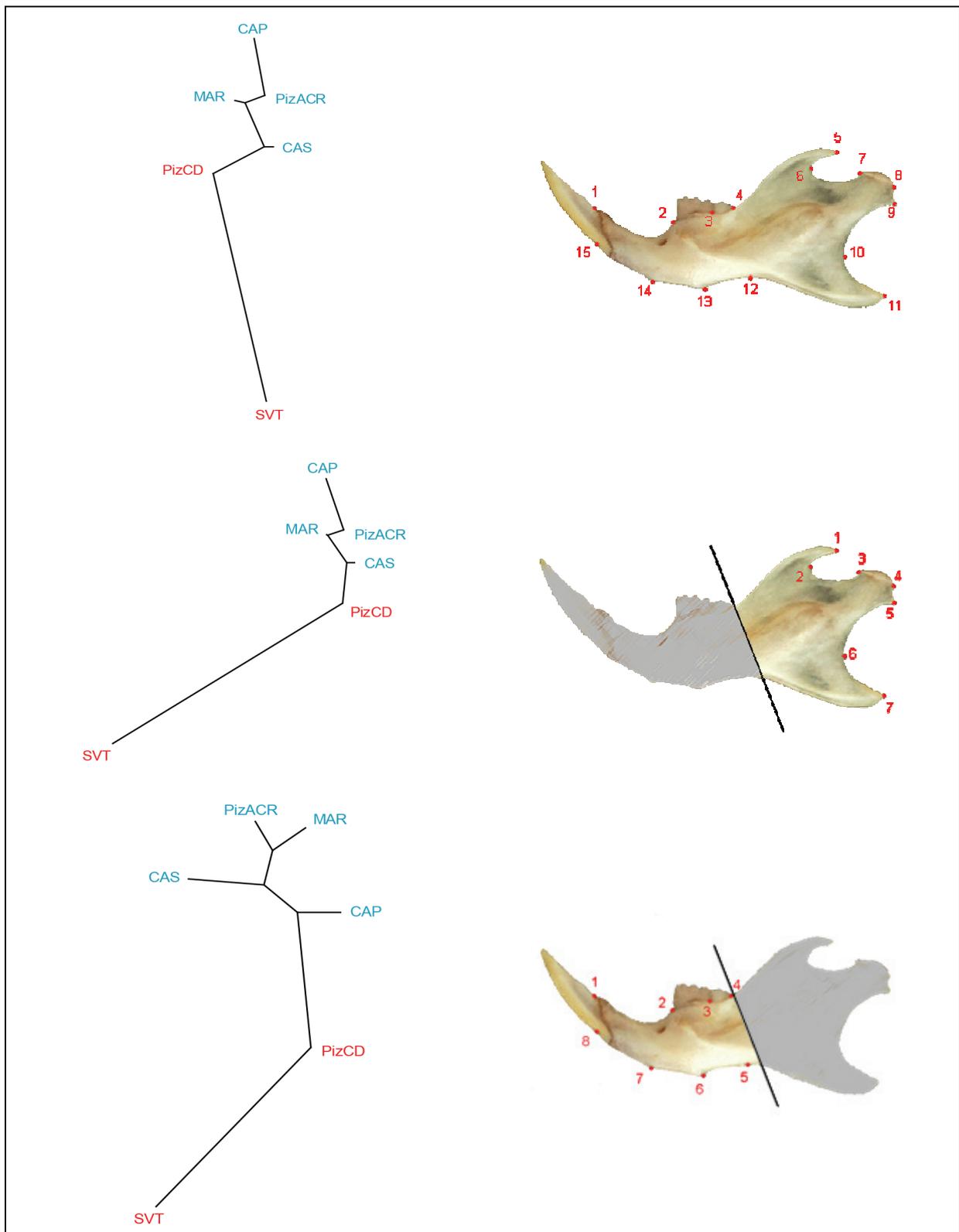
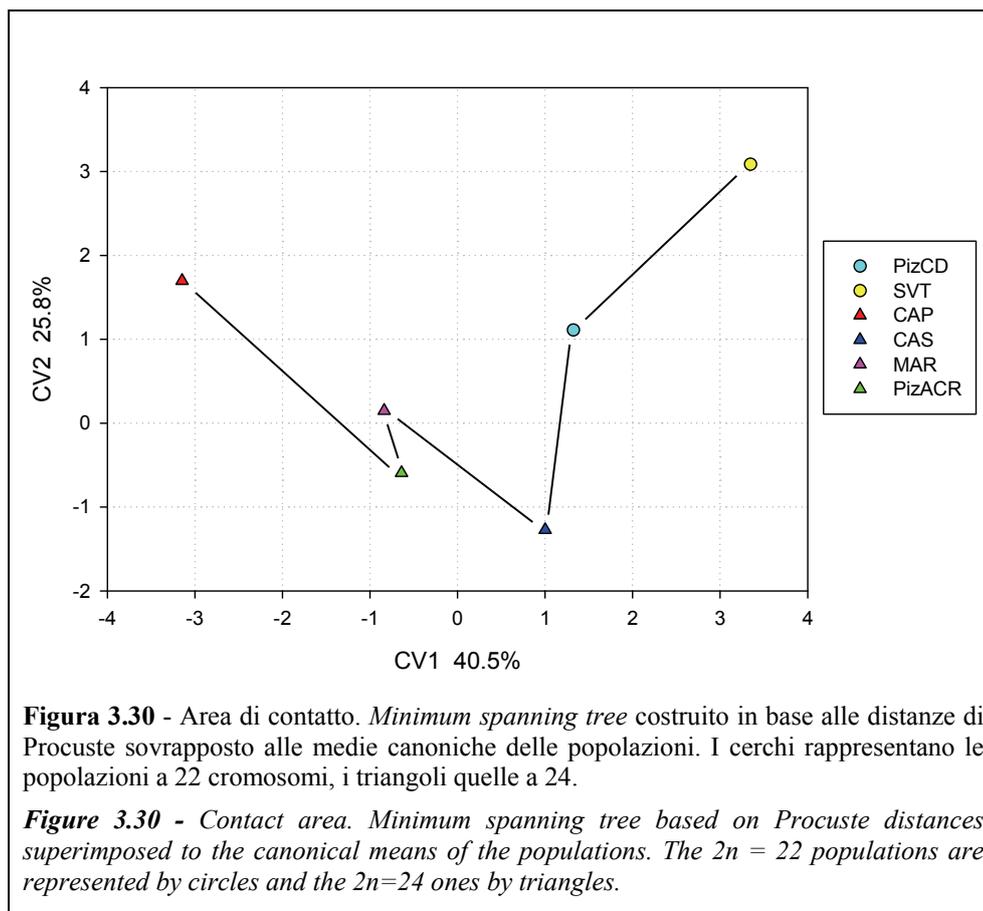


Figura 3.29 - Area di contatto. Alberi di massima verosimiglianza dei 3 gruppi di landmark costruiti in base alla *relativa warp score matrix* delle configurazioni di consenso delle "popolazioni". Le sigle delle popolazioni sono colorate secondo i gruppi cromosomici di appartenenza: $2n = 22$ (CD) rosso e $2n = 24$ (ACR) blu.

Figure 3.29 - Contact area. Maximum likelihood trees of the 3 landmarks groups based on the *relative warp score matrix* of the "populations" consensus configurations. The CD ($2n = 22$) and ACR ($2n = 24$) populations are respectively red and blue highlighted.



3.3.3.5 - Taglia: analisi univariata della varianza

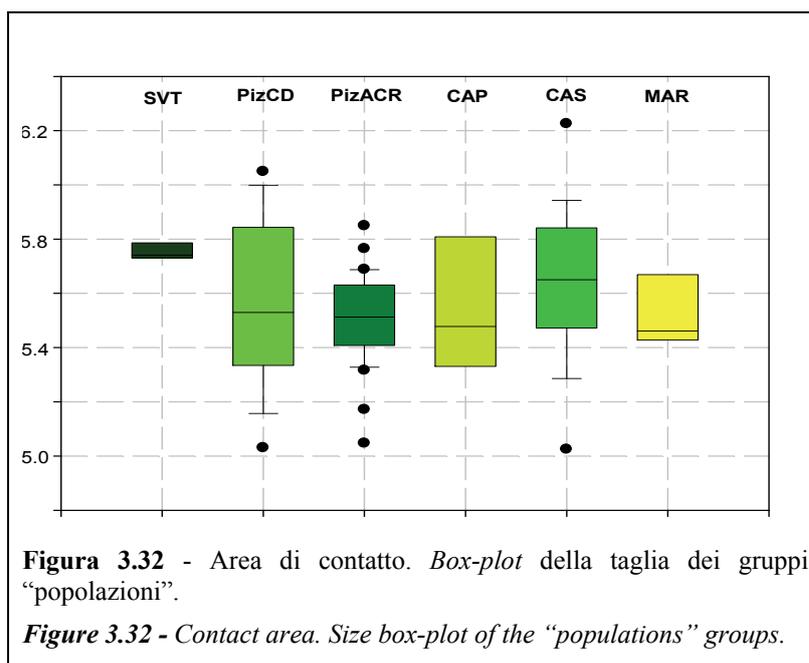
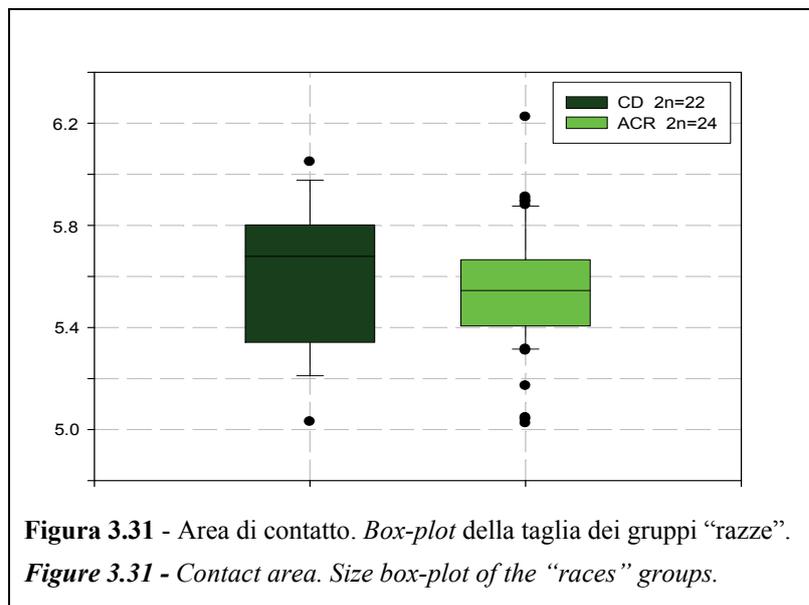
Per verificare la presenza di variazione significativa nella taglia è stata condotta l'ANOVA sul *centroid size* calcolato per ogni esemplare. Non sono state riscontrate differenze significative di taglia fra le razze, fra le popolazioni e fra i sessi. Anche le interazioni a coppie fra i tre effetti studiati non sono risultate significative. I risultati dell'ANOVA sono mostrati nella tabella 3.36.

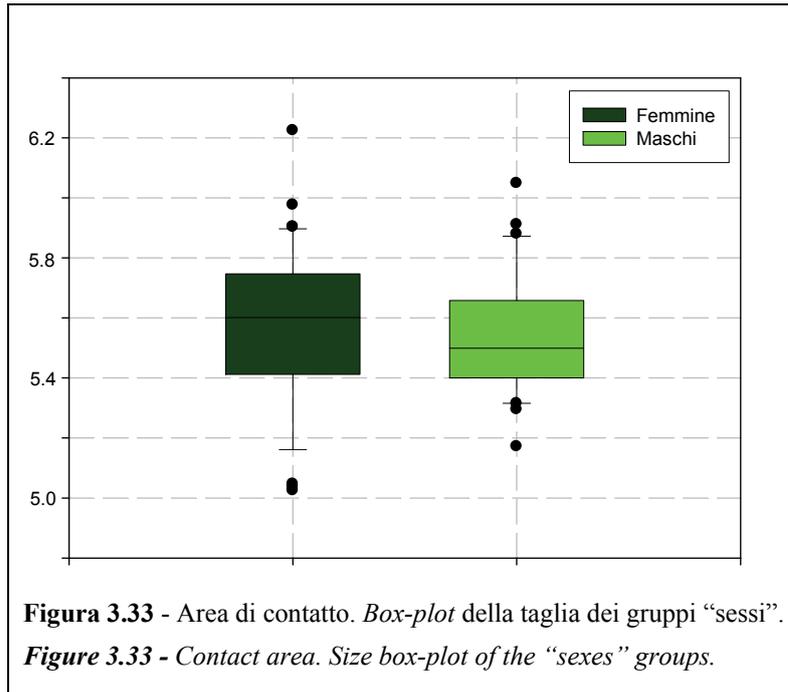
La dispersione dei valori del *centroid size* è stata visualizzata tramite 3 distinti *box-plot* relativi alle razze cromosomiche, alle popolazioni e ai sessi. La dispersione dei valori intorno alla media non mette in evidenza nette distinzioni fra gli effetti studiati (figure 3.31, 3.32 e 3.33).

Effetto	gl	F	p
Razza	1	0.73	0.3961
Popolazione	5	1.16	0.3345
Sesso	1	0.49	0.4863
Razza x Popolazione	5	1.16	0.3345
Razza x Sesso	1	0.37	0.5452
Popolazione x Sesso	4	0.24	0.9172

Tabella 3.36 - Area di contatto. Risultati dell'ANOVA condotta sul *centroid size* della mandibola.

Table 3.36 - Contact area. ANOVA performed on the mandible centroid size.





3.3.3.6 - Taglia: *test T di Student*

Per verificare la presenza di differenze significative fra coppie di popolazioni è stato condotto un *test T di Student* sulle medie dei *centroid size*. L'analisi non ha evidenziato differenze significative di taglia in nessun confronto effettuato ($p < 0.0033$ in tutti i confronti, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni) dimostrando un elevato tasso di omogeneità fra le sei popolazioni in esame.

3.3.2.7 - Correlazione fra variazione morfologica ed ambientale

Per stimare l'influenza della variabilità ambientale sulla variazione di forma è stata eseguita un'analisi dei minimi quadrati parziali fra la *weight matrix* e un insieme di variabili geografiche: latitudine, longitudine ed altitudine. Per quanto riguarda la taglia è stata eseguita una regressione semplice fra il *centroid size* e le stesse variabili geografiche. Entrambe le analisi sono state condotte sui descrittori della forma e della taglia dei singoli individui.

Il PLS ha evidenziato l'esistenza di una correlazione bassa e non significativa fra il primo e il terzo insieme di vettori, mentre è risultata significativa la correlazione fra il secondo insieme. Il primo vettore della forma e il primo vettore delle variabili descrivono il 64.8% della varianza totale, una consistente parte della varianza (31.8%) è descritta dal secondo insieme (tabella 3.37).

L'analisi dei singoli vettori delle variabili (tabella 3.38) ha mostrato un modello di variazione geografica influenzato in gran parte dalla latitudine per quanto riguarda il primo ($r = 0.89$) ed il terzo vettore delle variabili ($r = 0.84$), mentre il secondo vettore delle variabili ha presentato una variazione dovuta in massima parte ad un gradiente altitudinale. Le correlazioni fra il primo vettore della forma e il primo vettore delle variabili e fra il secondo vettore della forma e il secondo vettore delle variabili sono mostrate rispettivamente nelle figure 3.34 e 3.35.

Nella prima figura è più evidente il gradiente latitudinale (le popolazioni a 22 cromosomi sono localizzate più a sud rispetto a quelle a 24 cromosomi), mentre nella seconda quello altitudinale (la popolazione più in alto nel grafico è quella localizzata più a nord, le due popolazioni a 22 cromosomi, localizzate alla stessa quota, presentano lo stesso valore nell'asse delle ordinate).

L'analisi della taglia ha evidenziato assenza di correlazione fra il *centroid size* ed i tre parametri analizzati (latitudine, longitudine ed altitudine).

Vettori	Covarianza	Varianza (%)	Varianza cumulativa (%)	r
1	0.0107	64.8452	64.8452	0.40377
2	0.0075	31.8309	96.6761	0.48062
3	0.0024	3.3239	100.0000	0.34921

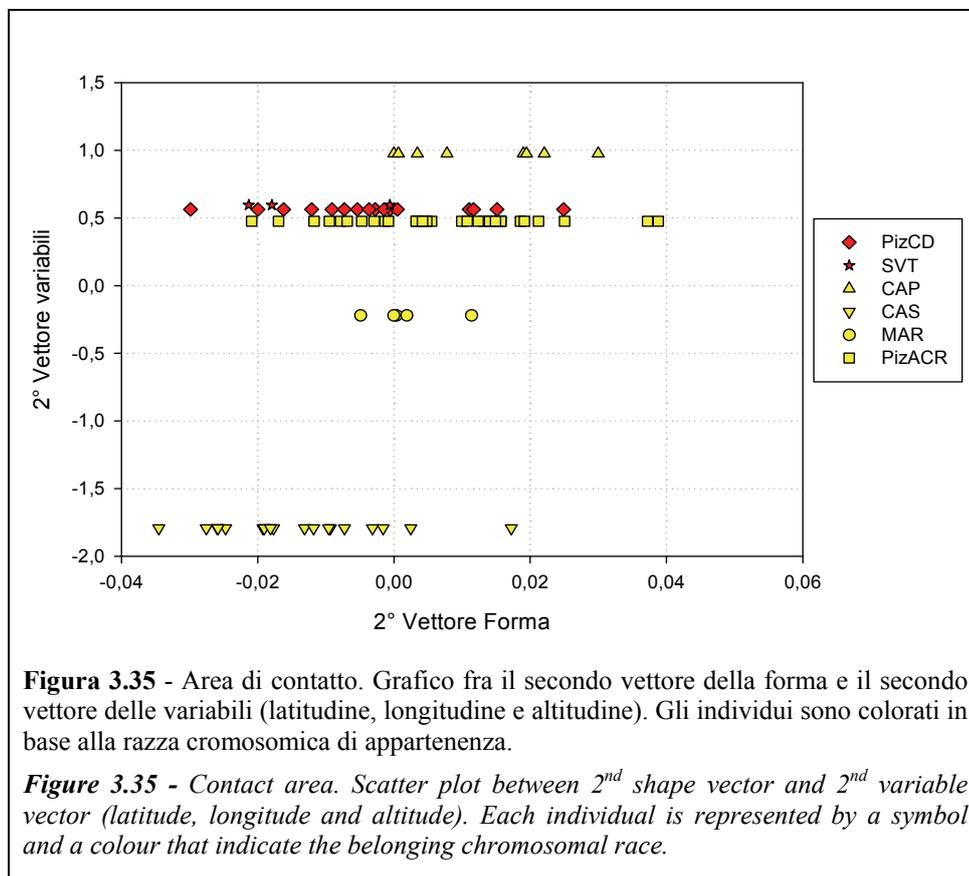
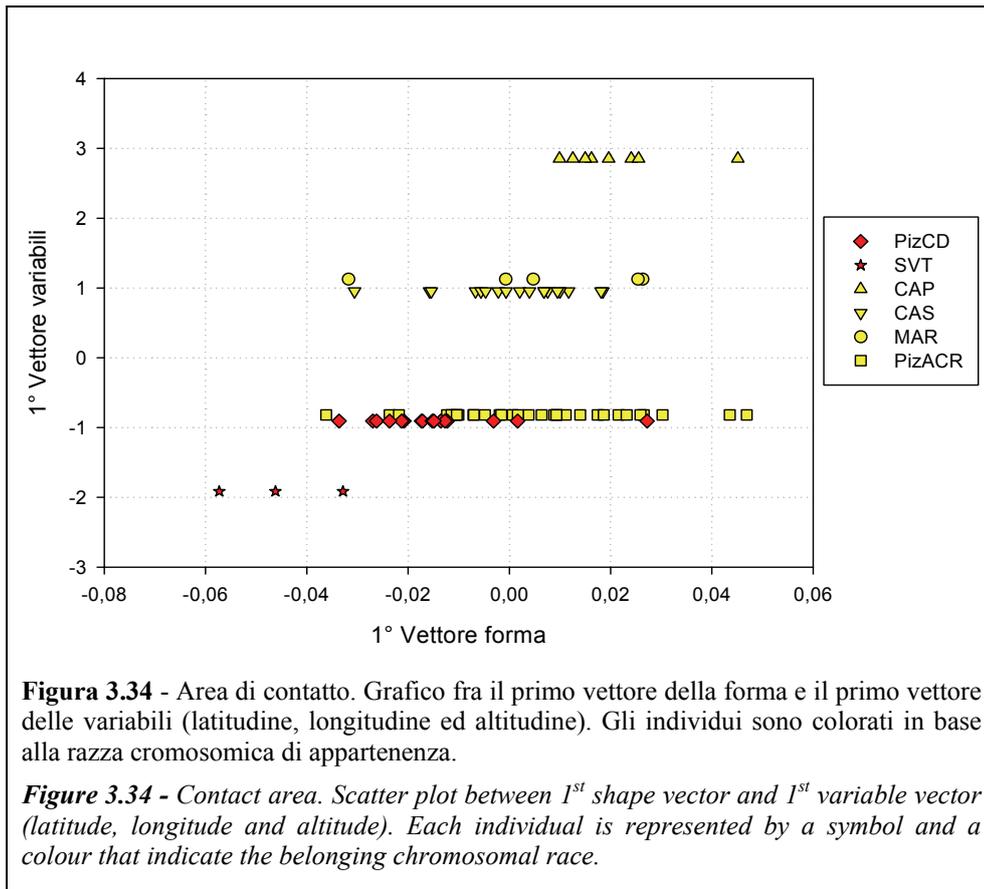
Tabella 3.37 - Area di contatto. Covarianza, percentuale di variazione, spiegata e cumulativa, e indice di correlazione fra gli insiemi di vettori. In grassetto sono evidenziate correlazioni significative.

Table 3.37 - Contact area. Covariation, explained and cumulative variation percentage and correlation index between vectors sets. Significance correlations are marked in bold.

Vettori variabili	Variabili originali		
	Latitudine	Longitudine	Altitudine
1	0.89860	0.07013	-0.08498
2	-0.49098	0.92508	0.39221
3	0.84605	-0.55180	0.46659

Tabella 3.38 - Area di contatto. Correlazione fra le variabili originali e i vettori delle variabili.

Table 3.38 - Contact area. Correlation between original variables and variable vectors.



3.3.4 - Analisi dell'intero campione

3.3.4.1 - Conformazione: analisi dei *relative warp*

L'analisi dei componenti principali condotta sulle *weight matrix* dell'intero campione a disposizione, 207 esemplari considerando le due aree di contatto e la popolazione di Anzio (ANZ), non ha evidenziato marcate differenze fra i gruppi cromosomici in esame. Una lieve variazione è rilevabile graficamente soprattutto sul vettore (RW1, 26.81%) che descrive la maggior parte della variazione morfologica, dove i gruppi sono scarsamente omogenei e distinguibili. Il gruppo che appare più separato dagli altri è quello corrispondente alla razza cromosomica ACR.

Nel grafico, gli individui corrispondenti alle tre razze cromosomiche (CD $2n = 22$, ACR $2n = 24$, $2n = 40$) e gli ibridi sono evidenziati con colori diversi (figura 3.36).

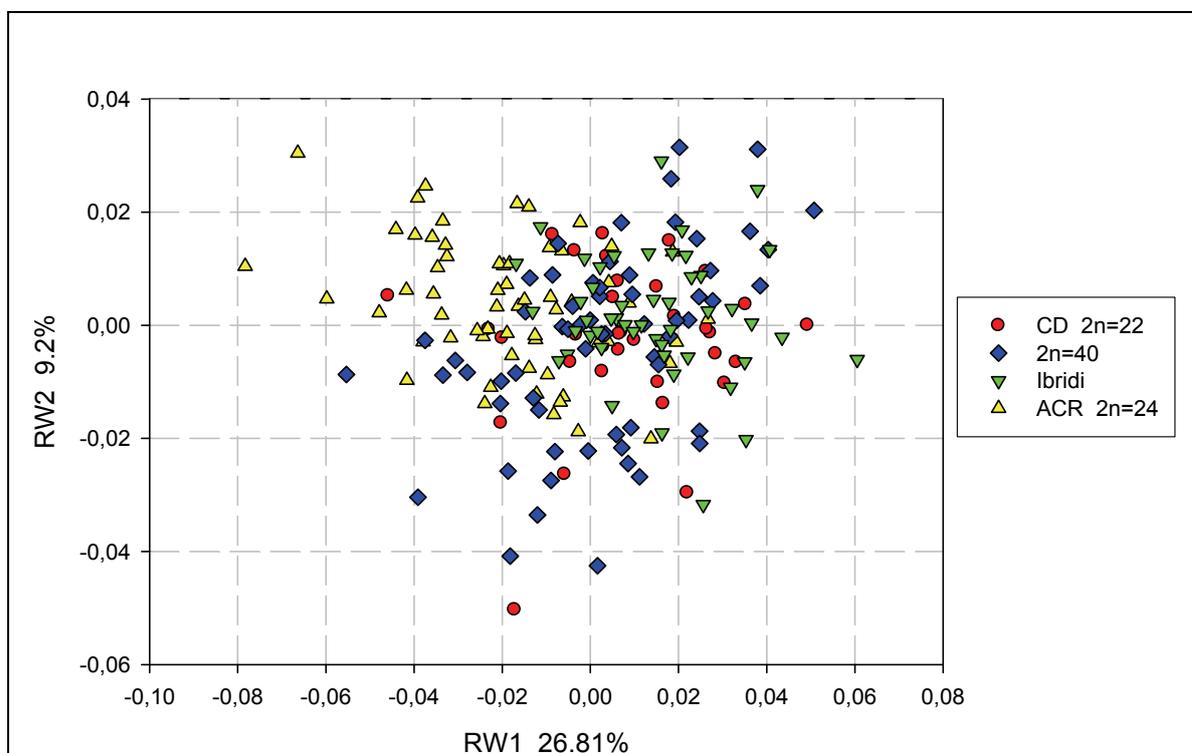


Figura 3.36 - Intero campione. Analisi delle componenti principali (*relative warp analysis*); nel grafico sono rappresentati tutti gli individui evidenziati per gruppo cromosomico di appartenenza.

Figure 3.36 - Entire sample. Principal component analysis (*relative warp analysis*). The individuals are represented by different symbols corresponding to the belonging chromosomal groups.

3.3.4.2 - Conformazione: analisi multivariata della varianza

La MANOVA condotta sulle 3 *weight matrix* dei 3 insiemi di dati in esame non ha evidenziato differenze significative fra gruppi cromosomici considerando i *landmark* del settore dentale. Le differenze sono, invece, risultate significative prendendo in considerazione tutti i *landmark* (al limite di significatività: $p = 0.0483$) e i *landmark* del settore muscolare della mandibola (altamente significativo: $p = 0.0011$). Nelle popolazioni sono state riscontrate differenze significative nei tre insiemi di dati in esame. Non è emerso dimorfismo sessuale in nessun caso analizzato. La MANOVA è stata quindi utilizzata per esaminare le interazioni a coppie fra gli effetti “razza”, “popolazione” e “sesso”; in nessun confronto effettuato l’interazione è risultata significativa.

Le tabelle che seguono mostrano i risultati della MANOVA (tabelle 3.39, 3.30 e 3.41).

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.689	52	1.25	0.0483
Popolazione	0.010	390	2.28	<.0001
Sesso	0.790	26	1.84	0.0515
Razza x Popolazione	0.551	104	0.98	0.5285
Razza x Sesso	0.693	78	0.87	0.7771
Popolazione x Sesso	0.084	390	1.07	0.2021

Tabella 3.39 - Intero campione. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* di tutti i *landmark*.

Table 3.39 - Entire sample. MANOVA performed on the *weight matrix* of all landmarks.

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.812	20	1.91	0.0111
Popolazione	0.167	150	2.35	<.0001
Sesso	0.911	10	1.85	0.0843
Razza x Popolazione	0.809	40	0.95	0.5571
Razza x Sesso	0.841	30	1.13	0.2922
Popolazione x Sesso	0.382	150	1.13	0.1380

Tabella 3.40 - Intero campione. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* dei 7 *landmark* del settore muscolare.

Table 3.40 - Entire sample. MANOVA performed on the *weight matrix* of the 7 landmarks of muscular area.

Effetto	Wilks' Lambda			
	Valore	gl	F	p
Razza	0.928	24	0.55	0.9609
Popolazione	0.128	180	2.24	<.0001
Sesso	0.940	12	0.99	0.4617
Razza x Popolazione	0.735	48	1.16	0.2235
Razza x Sesso	0.891	36	0.61	0.9645
Popolazione x Sesso	0.369	180	0.97	0.6082

Tabella 3.41 - Intero campione. Risultati della MANOVA condotta sulla *weight matrix* degli 8 *landmark* del settore dentale.

Table 3.41 - Entire sample. MANOVA performed on the *weight matrix* of the 8 landmarks of dental area.

3.3.4.3 - Conformazione: analisi delle variate canoniche

Lo studio della forma fra razze cromosomiche e fra popolazioni sono state visualizzate tramite un'analisi delle variate canoniche (CVA). Per quanto riguarda le differenze fra gruppi cromosomici, le prime due variate canoniche (CV1 e CV2) descrivono il 90.4% della variazione totale. Come si può vedere dal relativo grafico di ordinamento (figura 3.37), i quattro gruppi cromosomici sono scarsamente omogenei e non troppo distinguibili l'uno dall'altro. Il gruppo corrispondente alla razza ACR è quello meglio distinguibile, separandosi in modo abbastanza netto dagli altri sul 1° CV1 (67.1% della variazione totale).

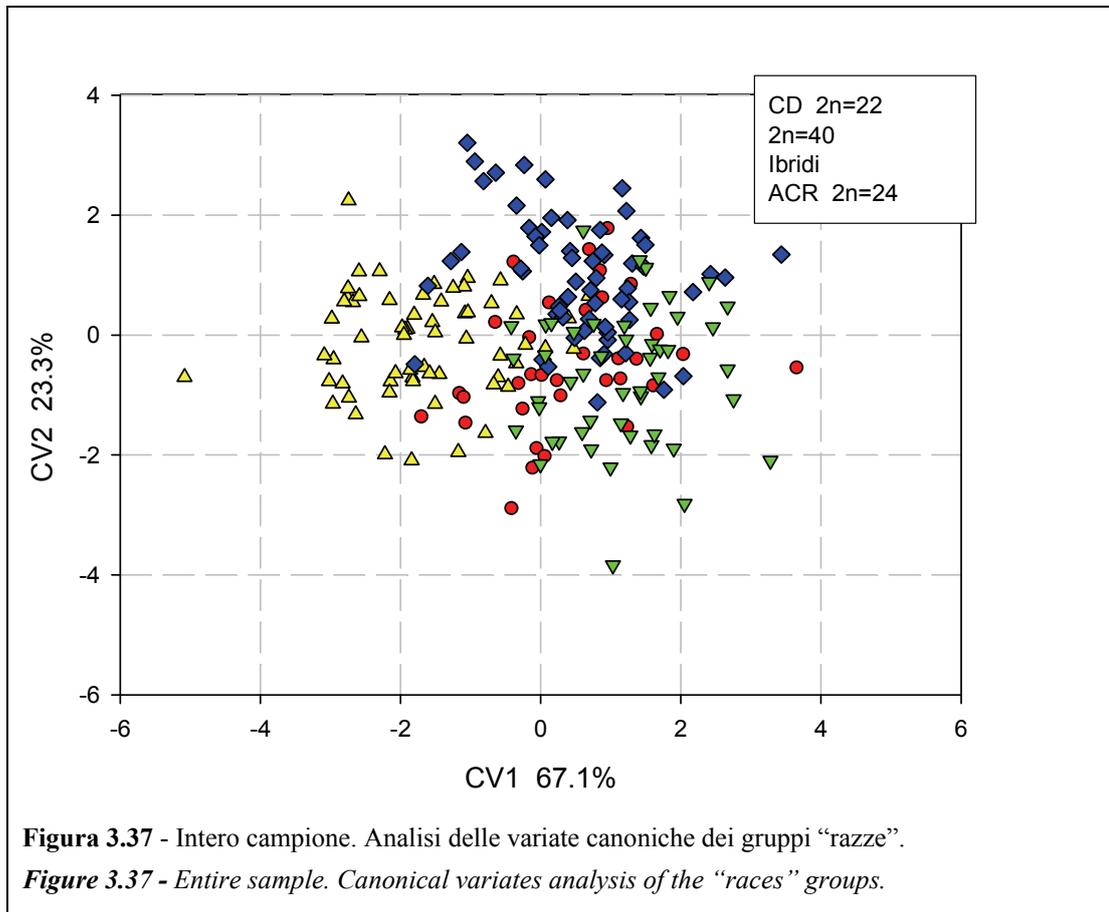
Le griglie di deformazione relative a CV1 hanno confermato la variazione conformazionale a carico del processo coronoide (avanzamento negli individui con cariotipo ACR rispetto agli altri tre gruppi cromosomici), dell'alveolo molare (contrazione in senso longitudinale nei tre gruppi cromosomici in esame rispetto agli individui ACR ed espansione, in questi ultimi, dell'estremità anteriore dell'alveolo incisivo in senso dorso-ventrale). È stata inoltre rilevata una marcata contrazione in senso longitudinale della zona mediana dell'alveolo incisivo ed una contrazione in senso dorso-ventrale del processo angolare degli individui ACR (figura 3.38).

Le griglie di deformazione relative a CV2 (in grado di discriminare la razza 2n = 40 dagli altri 3 gruppi cromosomici) mostrano un abbassamento della regione dell'alveolo molare accompagnata da un arretramento e da una contrazione in senso dorso-ventrale del processo

condilare degli individui $2n = 40$ rispetto a quelli degli altri tre gruppi cromosomici (figura 3.39).

L'analisi delle variate canoniche ha mostrato, inoltre, una separazione notevole anche fra le popolazioni geografiche. Le prime due variate canoniche (CV1 e CV2), che descrivono una variazione cumulata del 44.3% della variazione totale, mostrano dei gruppi in alcuni casi abbastanza omogenei e distinguibili (figura 3.40).

Da notare come le tre popolazioni costituite interamente da individui a 40 cromosomi (GRA, MNT e ANZ) si raggruppino nonostante la grande distanza geografica e la notevole variazione ambientale esistente fra la località di Anzio e le due popolazioni dell'area di ibridazione.



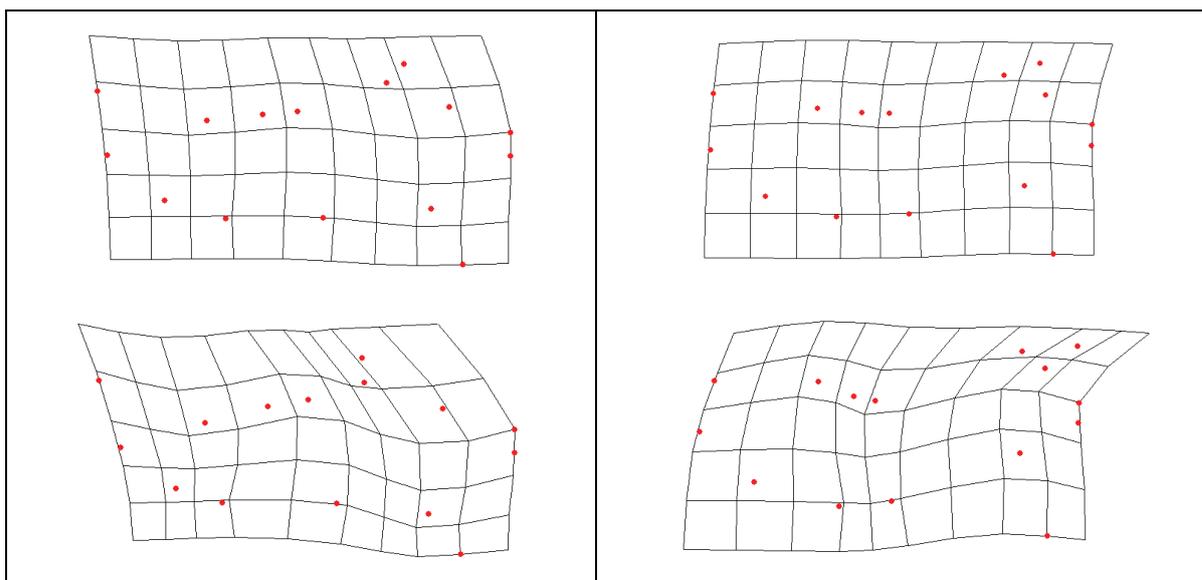


Figura 3.38 - Intero campione. Griglie di deformazione: cambiamenti di conformazione relativi ai valori negativi (ACR $2n = 24$), in alto a sinistra, e positivi (ibridi, CD $2n = 22$ e $2n = 40$), in alto a destra, di CV1 (67.1% varianza). In basso sono mostrate le stesse griglie con un fattore di ingrandimento 3x per consentire una migliore visualizzazione della deformazione.

Figure 3.38 - Entire sample. Deformation grids: conformational variations corresponding to the negative (ACR $2n = 24$, left above) and positive values (hybrids, CD $2n = 22$ and $2n = 40$, right above) of CV1 (variance: 67.1%). The same grids with a 3x magnification factor are shown below.

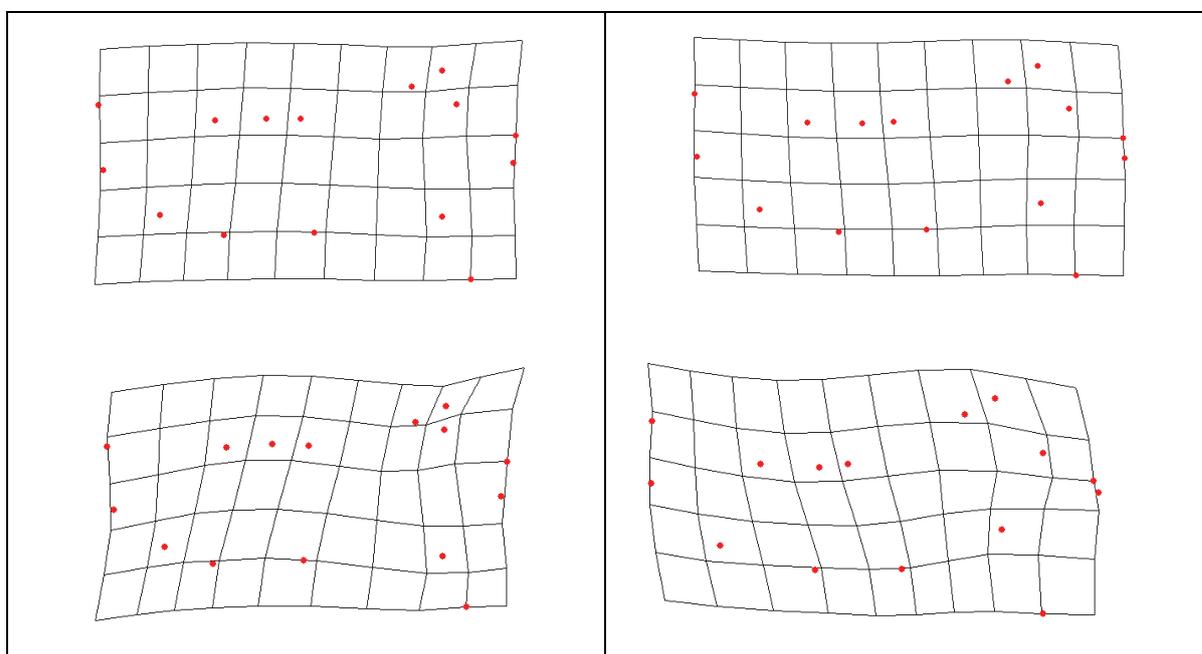
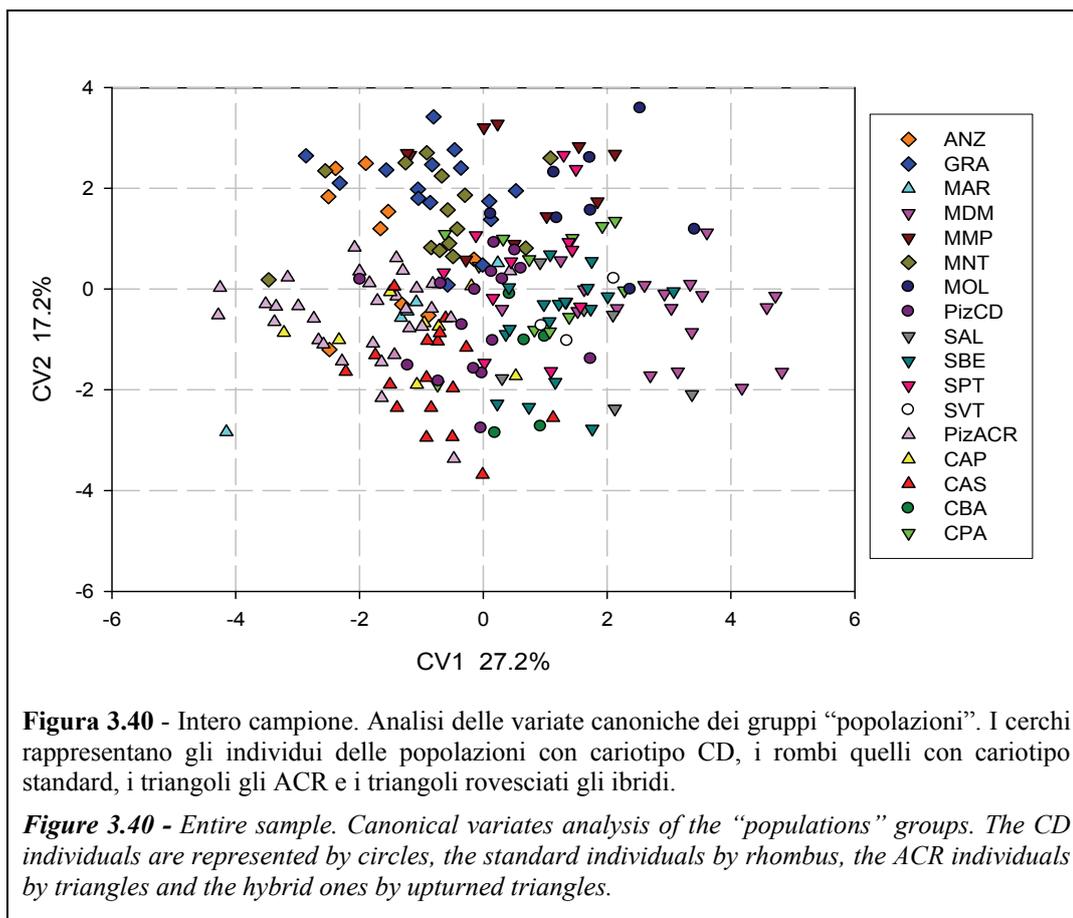


Figura 3.39 - Intero campione. Griglie di deformazione: cambiamenti di conformazione relativi ai valori negativi (ibridi, CD $2n = 22$ e ACR $2n = 24$), in alto a sinistra, e positivi ($2n = 40$), in alto a destra, di CV2 (23.3% varianza). In basso sono mostrate le stesse griglie con un fattore di ingrandimento 3x per consentire una migliore visualizzazione della deformazione.

Figure 3.39 - Entire sample. Deformation grids: conformational variations corresponding to the negative (hybrids, CD $2n = 22$ and ACR $2n = 24$, left above) and positive values ($2n = 40$, right above) of CV2 (variance: 23.3%). The same grids with a 3x magnification factor are shown below.



3.3.4.4 - Conformazione: analisi discriminante

Per ottenere informazioni sulla significatività delle differenze fra i tre gruppi cromosomici e fra le popolazioni, è stata condotta un’analisi discriminante basata sul *test* di Hotelling T^2 . In questo modo sono state saggiate le differenze a coppie fra i gruppi cromosomici e fra le popolazioni, espresse dalle distanze di Mahalanobis.

Il *test* effettuato sui gruppi cromosomici mostra una differenziazione significativa fra tutti i confronti effettuati ad eccezione di quello fra la razza CD e gli ibridi (tabella 3.42).

Il *test* effettuato sulle popolazioni mostra una differenza significativa in gran parte dei confronti (88 confronti significativi su 135), ma non è evidente una netta correlazione fra differenze significative e gruppo cromosomico di appartenenza delle popolazioni (tabella 3.43).

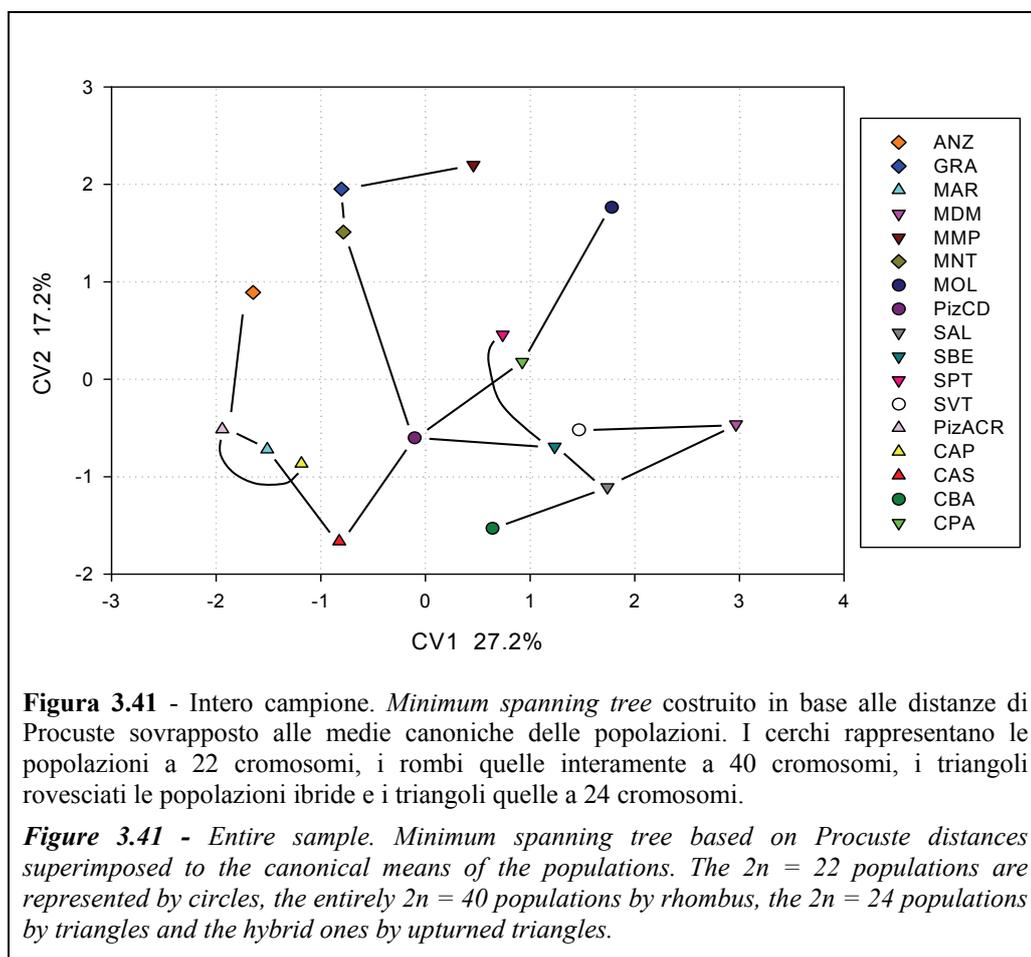
I rapporti reciproci fra le popolazioni sono stati visualizzati tramite gli alberi di massima verosimiglianza calcolati in base alle *relative warp score matrix* dei tre insiemi di

landmark sui quali è stata condotta la MANOVA (mandibola completa, settore muscolare e settore dentale). Nei tre alberi non è chiara la separazione delle popolazioni nei tre gruppi cromosomici in esame (figura 3.42), risultato confermato dal *minimum spanning tree* (MST) condotto sulle distanze di Procuste fra le popolazioni stesse (figura 3.41)

	22	24	40	Ibridi
22	-			
24	<0.0001	-		
40	0.0025	<0.0001	-	
Ibridi	0.4001	<0.0001	<0.0001	-

Tabella 3.42 - Intero campione. Analisi discriminante: valori di p del *test* di Hotelling T^2 effettuato sulle distanze di Mahalanobis. In grassetto sono evidenziate valori che indicano differenze significative fra le “razze” ($p < 0.0083$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.42 - Entire sample. Discriminant analysis: p-values of the Hotelling T^2 test performed on the Mahalanobis distances. Significance differences between “races” groups are marked in bold ($p < 0.0083$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).



	ANZ	CAP	CAS	CBA	CPA	GRA	MAR	MDM
ANZ	-							
CAP	<.0001	-						
CAS	<.0001	<.0001	-					
CBA	<.0001	<.0001	0.0009	-				
CPA	<.0001	<.0001	<.0001	0.0007	-			
GRA	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	-		
MAR	<.0001	0.1298	0.2546	0.0014	0.0003	0.0371	-	
MDM	<.0001	-						
MMP	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0434	0.0057	<.0001
MNT	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.1087	0.0169	<.0001
MOL	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0042	<.0001	<.0001	<.0001
PIZACR	<.0001	0.0005	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.8264	<.0001
PIZCD	<.0001	<.0001	0.0008	0.0005	0.0005	<.0001	0.3199	<.0001
SAL	<.0001	<.0001	<.0001	0.0011	0.0006	<.0001	0.0009	0.0002
SBE	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0006	<.0001	0.0064	<.0001
SPT	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0037	<.0001
SVT	<.0001	<.0001	0.0015	0.0119	0.0032	0.0003	0.0056	0.0019

	MMP	MNT	MOL	PIZACR	PIZCD	SAL	SBE	SPT
ANZ								
CAP								
CAS								
CBA								
CPA								
GRA								
MAR								
MDM								
MMP	-							
MNT	0.0018	-						
MOL	0.0001	0.0002	-					
PIZACR	<.0001	0.0002	<.0001	-				
PIZCD	<.0001	0.0009	<.0001	<.0001	-			
SAL	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	0.0139	-		
SBE	<.0001	<.0001	0.0005	<.0001	0.0168	0.1125	-	
SPT	<.0001	0.0067	0.0010	<.0001	0.0251	0.0390	0.0208	-
SVT	0.0005	0.0011	0.0015	<.0001	0.0317	0.0200	0.0126	0.0087

Tabella 3.43 - Intero campione. Analisi discriminante: valori di p del *test* di Hotelling effettuato sulle distanze di Mahalanobis. In grassetto sono evidenziate valori che indicano differenze significative fra le popolazioni ($p < 0.0003$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.43 - Entire sample. Discriminant analysis: *p*-values of the Hotelling T^2 test performed on the Mahalanobis distances. Significance differences between populations are marked in bold ($p < 0.0003$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

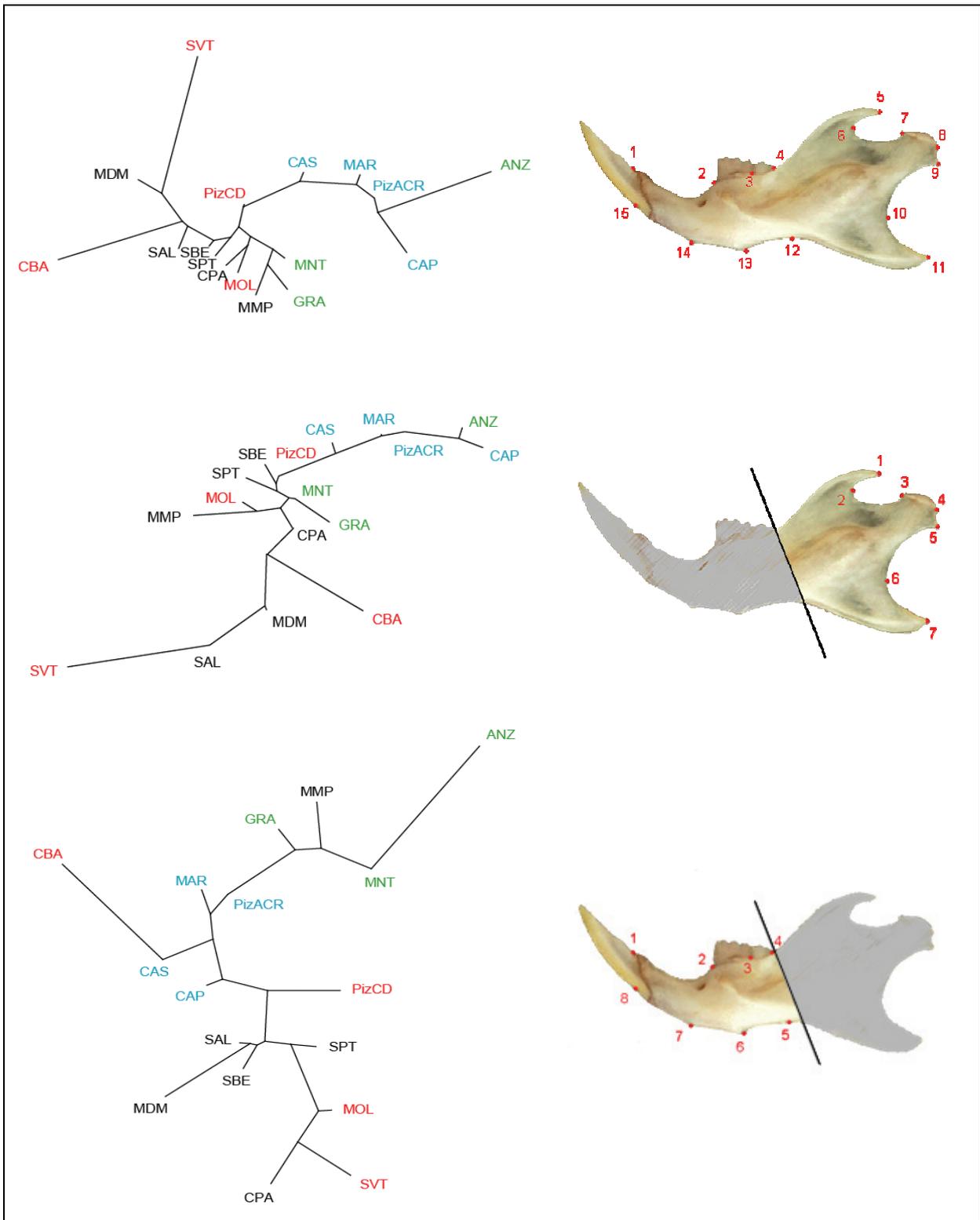


Figura 3.42 - Intero campione. Alberi di massima verosimiglianza dei 3 gruppi di landmark costruiti in base alla relativa warp score matrix delle configurazioni di consenso delle "popolazioni". Le sigle delle popolazioni sono colorate secondo i gruppi cromosomici di appartenenza: 2n = 22 (CD) rosso, 2n = 24 (ACR) blu, 2n = 40 verde e ibridi nero.

Figure 3.42 - Entire sample. Maximum likelihood trees of the 3 landmarks groups based on the relative warp score matrix of the "populations" consensus configurations. The CD (2n = 22), ACR (2n = 24), standard (2n = 40) and hybrid populations are respectively red, blue, green and black highlighted.

3.3.2.5 - Taglia: analisi univariata della varianza

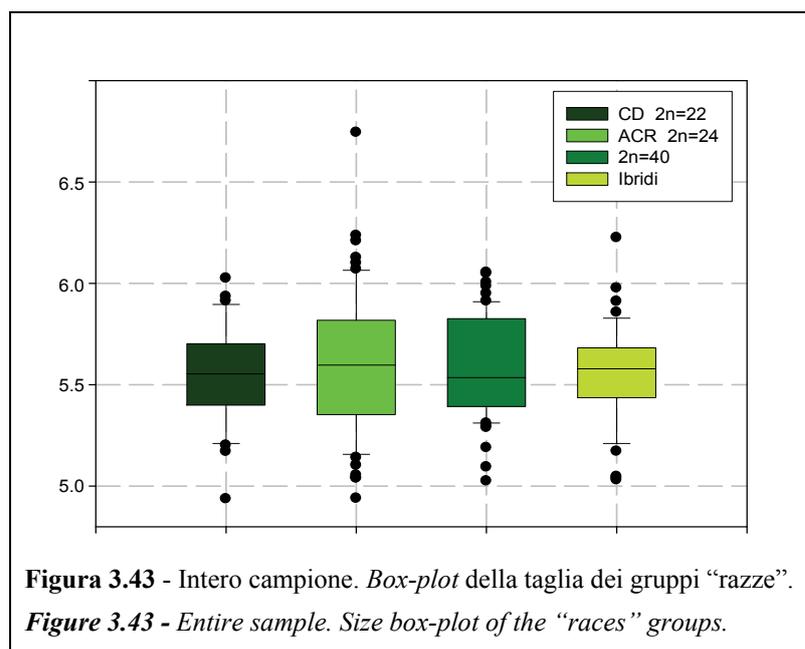
Per verificare la presenza di variazione significativa nella taglia è stata condotta l'ANOVA del *centroid size* calcolato per ognuno dei 207 esemplari. Sono state riscontrate differenze altamente significative di taglia fra le razze e fra le popolazioni. E' stato riscontrato anche un certo grado di dimorfismo sessuale, anche se al limite della significatività ($p = 0.0451$). Le interazioni fra i tre effetti esaminati sono risultate non significative. I risultati dell'ANOVA sono mostrati nella tabella 3.44.

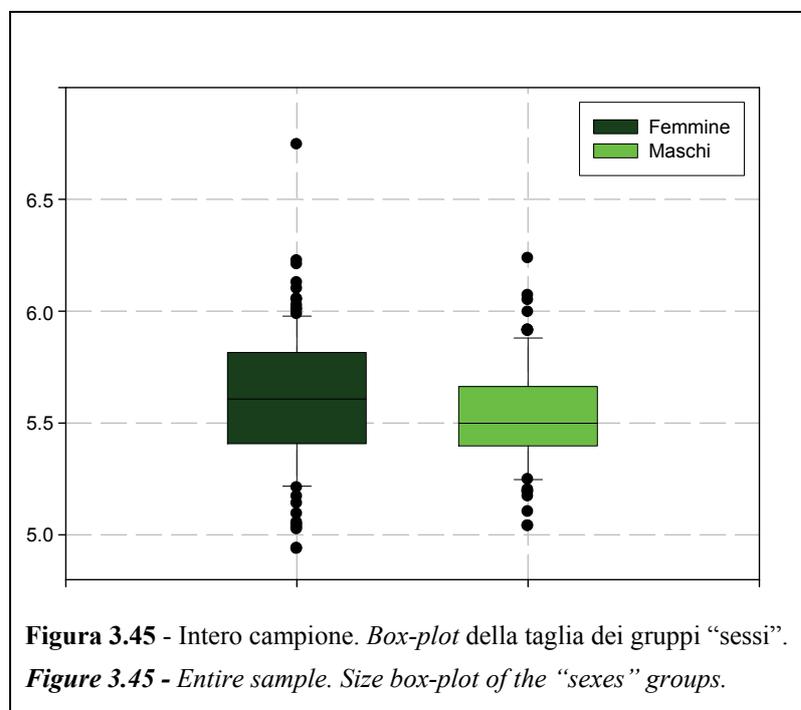
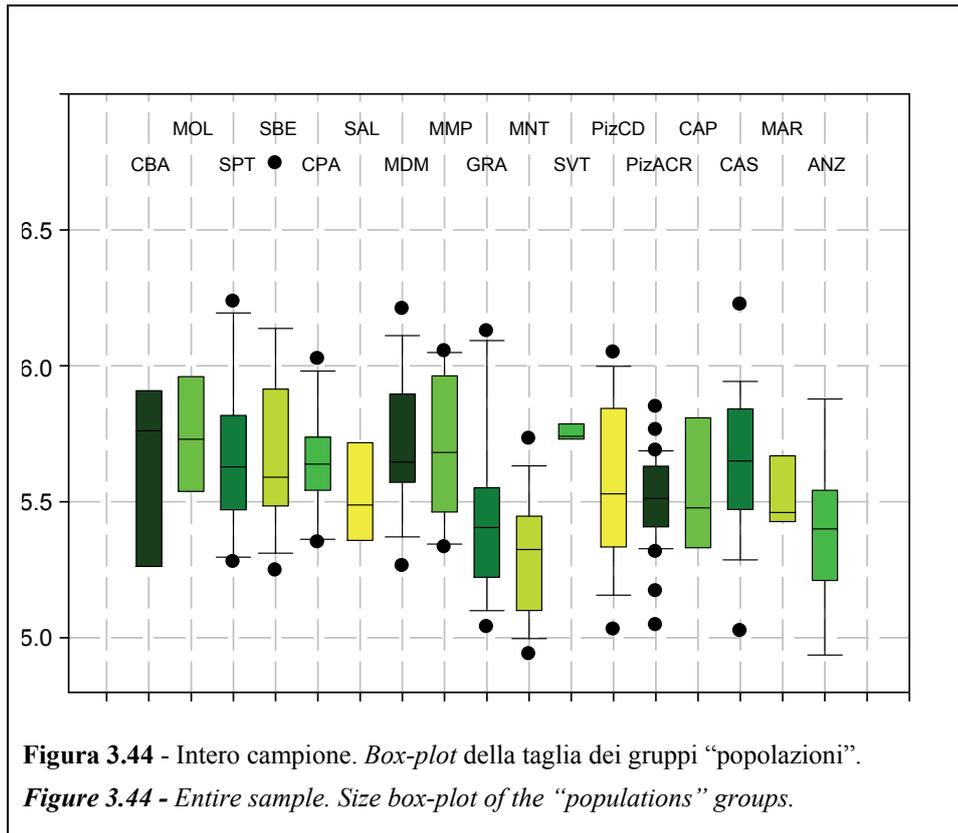
La dispersione dei valori del *centroid size* è stata visualizzata tramite tre distinti *box-plot* relativi ai gruppi cromosomici, alle popolazioni e ai sessi. La dispersione dei valori intorno alla media non mette in evidenza nette distinzioni fra gli effetti studiati (figure 3.43, 3.44 e 3.45).

Effetto	gl	F	P
Razza	3	6.49	0.0003
Popolazione	16	2.86	0.0003
Sesso	1	4.06	0.0451
Razza x Popolazione	3	0.00	1.0000
Razza x Sesso	3	0.53	0.6615
Popolazione x Sesso	15	1.06	0.3952

Tabella 3.44 - Intero campione. Risultati dell'ANOVA condotta sul *centroid size* della mandibola.

Table 3.44 - Entire sample. ANOVA performed on the mandible centroid size.





3.3.4.6 - Taglia: *test T di Student*

Per verificare la presenza di differenze significative all'interno dei gruppi cromosomici e delle popolazioni è stato condotto un *test T di Student* sulle medie dei *centroid size* dei due effetti.

Per quanto riguarda i gruppi cromosomici, è risultata significativa solamente la differenza di taglia fra gli individui con cariotipo standard ($2n = 40$) e gli ibridi (tabella 3.45), questi ultimi mediamente di dimensioni maggiori. In nessuno dei confronti fra le diciassette popolazioni in esame sono state rilevate differenze significative ($p < 0.0003$ in tutti i confronti, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni), anche se le popolazioni interamente a 40 cromosomi (GRA, MNT e ANZ) mostrano mediamente una taglia minore.

La differenza di taglia osservata fra i sessi mette in evidenza una dimensione maggiore delle femmine rispetto ai maschi.

	22	24	40	Ibridi
22	-			
24	NS	-		
40	NS	NS	-	
Ibridi	NS	NS	***	-

Tabella 3.45 - Intero campione. Analisi discriminante: *test T di Student* effettuato sulle medie del *centroid size* dei gruppi “ $2n = 22$ ”, “ $2n = 24$ ”, “ $2n = 40$ ” ed “ibridi”. Gli asterischi indicano differenze significative ($p < 0.0083$, soglia corretta tramite la procedura di Bonferroni).

Table 3.45 - Entire sample. Discriminant analysis: Student's T-test performed on the centroid size means of the “ $2n = 22$ ”, “ $2n = 24$ ”, “ $2n = 40$ ” and “hybrids” groups. Significance differences are indicated by asterisks ($p < 0.0083$, corrected threshold through the Bonferroni procedure).

3.3.4.7 - Correlazione fra variazione morfologica ed ambientale

Per stimare l'influenza della variabilità ambientale sulla variazione di forma è stata eseguita un'analisi dei minimi quadrati parziali (PLS) fra la *weight matrix* e un'insieme di variabili geografiche: latitudine, longitudine ed altitudine. Per quanto riguarda la taglia è stata

eseguita una regressione semplice fra il *centroid size* e le stesse variabili geografiche. Entrambe le analisi sono state condotte sui descrittori della forma e della taglia dei singoli individui.

Il PLS ha evidenziato l'esistenza di una correlazione bassa, ma significativa, fra i tre insiemi di vettori. Il primo vettore della forma e il primo vettore delle variabili descrivono gran parte della covarianza totale, 83.4% (tabella 3.46). L'analisi dei singoli vettori delle variabili (tabella 3.47) ha mostrato un modello di variazione geografica influenzato dalla latitudine ($r = 0.82$) e dalla longitudine ($r = 0.92$) per quanto riguarda il primo dei tre vettori, mentre il secondo e terzo vettore delle variabili hanno presentato una variazione dovuta in massima parte ad un gradiente latitudinale sud-nord. La correlazione fra il primo vettore della forma e il primo vettore delle variabili è mostrato in figura 3.46, dove si evidenzia una netta separazione solo fra gli individui dell'area di contatto e il resto del campione.

L'analisi della taglia ha evidenziato assenza di correlazione fra il *centroid size* e la latitudine ($p = 0.824$) e fra il *centroid size* e la longitudine ($p = 0.091$), mentre è risultata significativa la correlazione fra taglia e altitudine ($p = 0.048$). In quest'ultimo caso, gli individui di taglia più grande sono localizzati ad altitudini maggiori.

Vettori	Covarianza	Varianza (%)	Varianza cumulativa (%)	r
1	0.0131	83.4181	83.4181	0.47638
2	0.0057	15.6878	99.1059	0.42127
3	0.0014	0.8941	100.0000	0.47522

Tabella 3.46 - Intero campione. Covarianza, percentuale di variazione, spiegata e cumulativa, e indice di correlazione fra gli insiemi di vettori. In grassetto sono evidenziate correlazioni significative.

Table 3.46 - Entire sample. Covariation, explained and cumulative variation percentage and correlation index between vectors sets. Significance correlations are marked in bold.

Vettori variabili	Variabili originali		
	Latitudine	Longitudine	Altitudine
1	0.82597	0.92380	0.33863
2	0.95437	0.31544	0.19152
3	0.97737	0.61435	-0.03917

Tabella 3.47 - Intero campione. Correlazione fra le variabili originali e i vettori delle variabili.

Table 3.47 - Entire sample. Correlation between original variables and variable vectors.

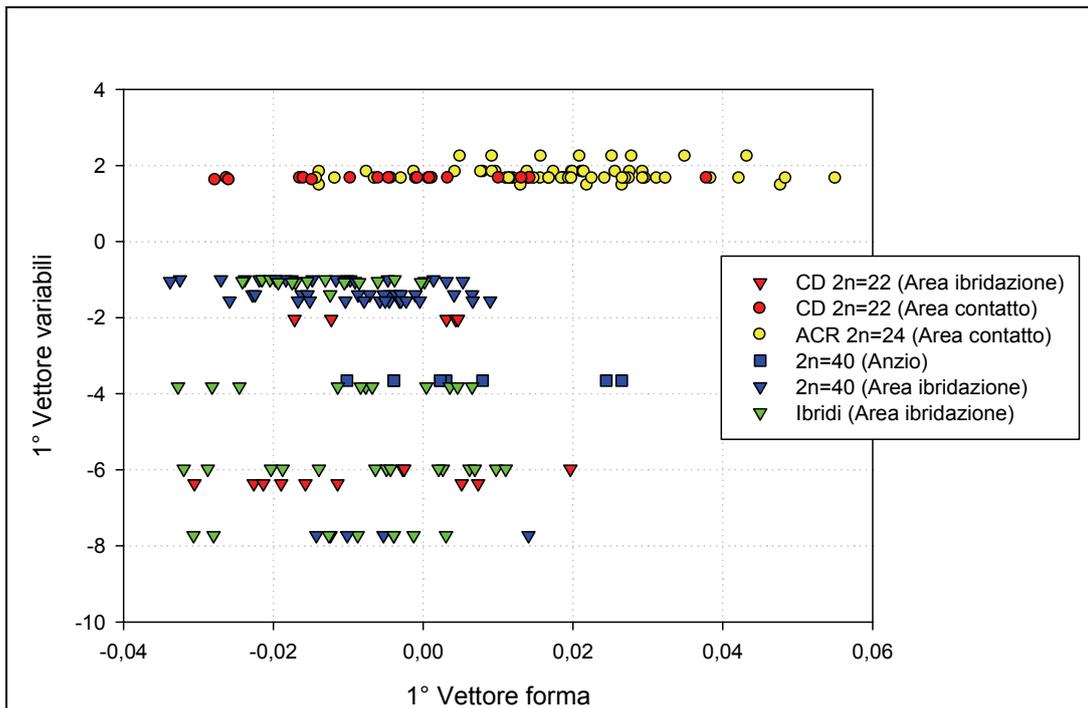


Figura 3.46 - Intero campione. Grafico fra il primo vettore della forma e il primo vettore delle variabili (latitudine, longitudine e altitudine). Gli individui sono colorati per gruppo cromosomico e rappresentati da simboli che indicano la zona di appartenenza.

Figure 3.46 - Entire sample. Scatter plot between 1st shape vector and 1st variable vector (latitude, longitude and altitude). Each individual is represented by a colour that indicates the belonging chromosomal group and by a symbol that indicates the belonging geographical zone.

3.4 - Correlazione fra variazione genetica e morfologica

Per verificare la congruenza fra variabilità genetica e morfologica sono state confrontate, tramite il *test* di Mantel, due matrici di distanza costruite a partire da distanze genetiche (D) e morfologiche (distanze di Procuste). Il *test* è stato applicato ad entrambe le aree di contatto. Le popolazioni inserite nelle matrici sono le stesse utilizzate nelle precedenti analisi, ma costituite da un sottocampione per il quale sono disponibili sia dati genetici che morfologici.

Non è emersa alcuna correlazione fra variabilità genetica e morfologica sia nell'area di ibridazione ($r = 0.03$, $p = 0.53$) che nell'area di contatto ($r = 0.02$, $p = 0.56$).

L'incongruenza fra i due tipi di variazione è messa in evidenza anche negli alberi di massima verosimiglianza costruiti in base alle matrici di distanza genetica (frequenze alleliche delle popolazioni) e morfologica (*relative warp score matrix* delle configurazioni di consenso delle stesse popolazioni). La situazione è, però, diversa nelle due aree.

Per quanto riguarda l'area di ibridazione (figura 3.47), è evidente la netta assenza di correlazione, infatti, anche popolazioni appartenenti alla stessa razza cromosomica non trovano corrispondenza nei due alberi.

Nell'area di contatto, invece, anche se variano le corrispondenze fra le popolazioni all'interno della razza ACR, i due gruppi cromosomici (CD e ACR) si separano in entrambi i tipi di alberi (per una corretta visualizzazione degli alberi si vedano gli *unrooted tree* delle figure 3.10 e 3.30). Questa situazione potrebbe riflettere la presenza di correlazione fra variabilità genetica e morfologica tra le due razze cromosomiche in esame.

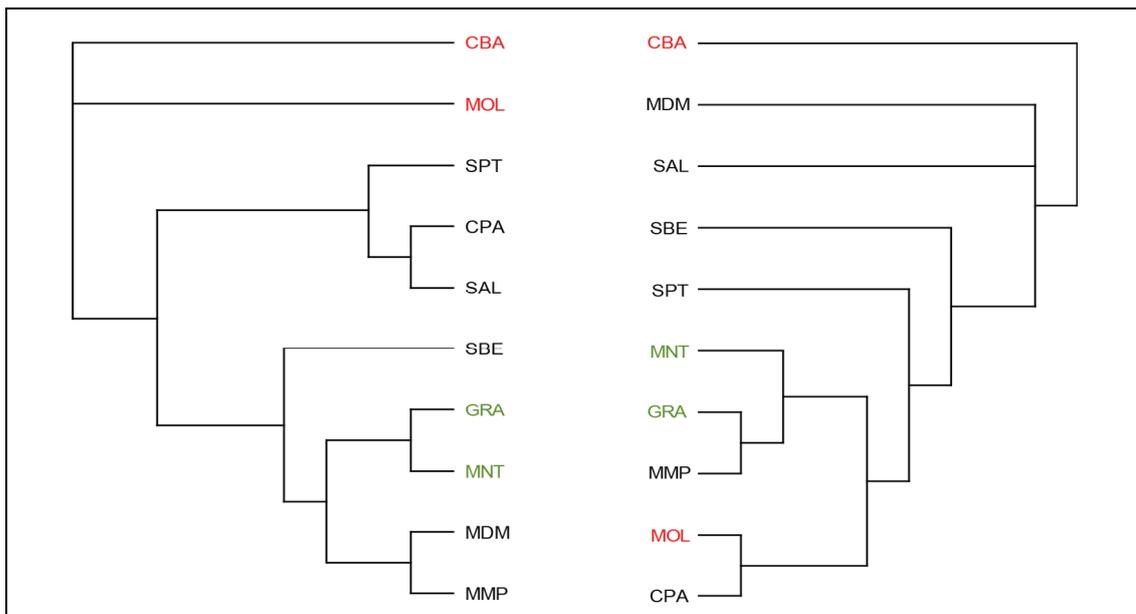


Figura 3.47 - Area di ibridazione. Alberi di massima verosimiglianza costruiti in base alle frequenze alleliche delle popolazioni (sinistra) e alla *relative warp score matrix* delle configurazioni di consenso delle stesse popolazioni (destra). Le sigle delle popolazioni sono colorate secondo i gruppi cromosomici di appartenenza: $2n = 22$ (CD) rosso, $2n = 40$ verde ed ibridi nero.

Figure 3.47 - Hybridization area. Maximum likelihood trees based on allele frequencies of the populations (left) and on relative warp score matrix of the consensus configuration of the same populations (right). Acronyms of the populations are tinted following the chromosomal groups: $2n = 22$ (CD) red, $2n = 40$ green and hybrids black.

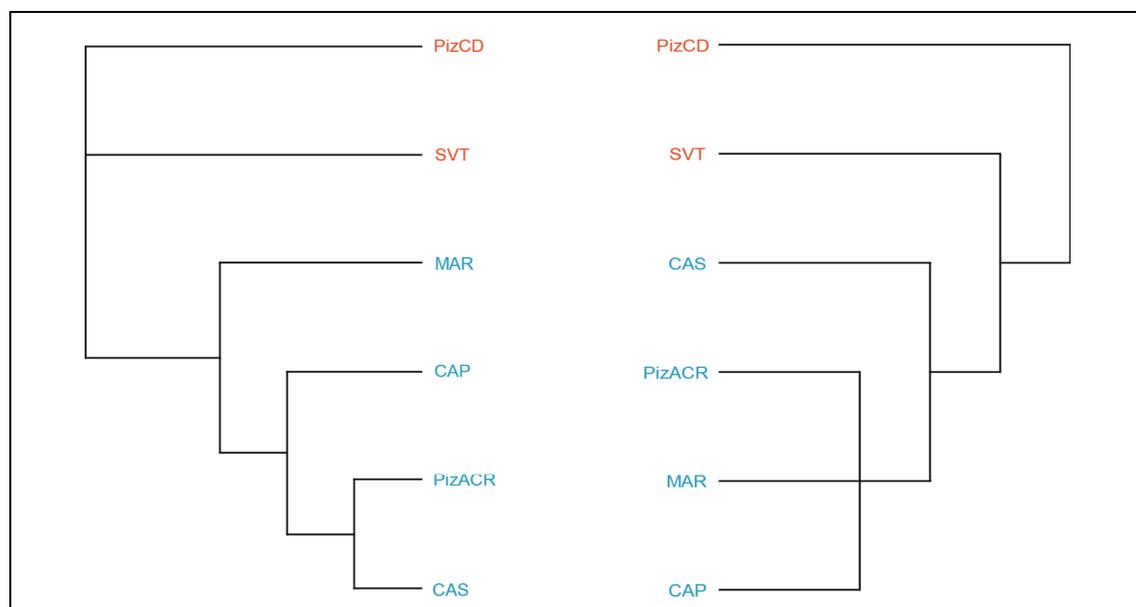


Figura 3.48 - Area di contatto. Alberi di massima verosimiglianza costruiti in base alle frequenze alleliche delle popolazioni (sinistra) e alla *relative warp score matrix* delle configurazioni di consenso delle stesse popolazioni (destra). Le sigle delle popolazioni sono colorate secondo le razze cromosomiche di appartenenza: $2n = 22$ (CD) rosso e $2n = 24$ (ACR) blu.

Figure 3.48 - Contact area. Maximum likelihood trees based on allele frequencies of the populations (left) and on relative warp score matrix of the consensus configuration of the same populations (right). Acronyms of the populations are tinted following the chromosomal races: $2n = 22$ (CD) red, $2n = 24$ (ACR) blue.

4 - DISCUSSIONE

Dai risultati ottenuti emergono numerosi punti di discussione concernenti il differenziamento genetico fra le razze cromosomiche nelle due aree di contatto, la variabilità morfologica mostrata all'interno del campione in esame e la correlazione esistente fra genetica e morfologia.

Inoltre, importante punto di discussione, è il ruolo dei riordinamenti cromosomici all'interno della sottospecie *Mus musculus domesticus* in relazione al flusso genico analizzato. In particolar modo sarà discusso come le incompatibilità cariotipiche operino da barriera al libero scambio di geni fra le razze cromosomiche in esame e come le diverse regioni cromosomiche, in particolari condizioni di eterozigosi strutturale, siano soggette ad un diverso tasso di ricombinazione che si riflette in un flusso genico dipendente dalla posizione del locus sul cromosoma.

Dalla scoperta del primo topo robertsoniano da parte di Gropp *et al.* (1969), numerosi lavori hanno cercato di chiarire la natura del differenziamento cromosomico in *Mus musculus domesticus* incentrandosi sugli eventi molecolari che stanno alla base della fusione robertsoniana, sul modello di formazione delle razze, sull'analisi delle aree di ibridazione e sulla fertilità degli ibridi. In particolare, l'analisi della fertilità degli ibridi naturali ha mostrato come la bassa *fitness* associata agli eterozigoti strutturali possa avere un ruolo come barriera al flusso genico e quindi nell'accumulo eventuale di differenze genetiche fra le razze cromosomiche (Capanna e Redi, 1988; Hauffe e Searle, 1998; Castiglia e Capanna, 2002).

Il flusso genico è stato analizzato solo raramente con metodi diretti tramite l'ausilio di marcatori molecolari. Il basso potere discriminante di alcuni di questi marcatori sia mitocondriali (citocromo b e d-loop) che nucleari (allozimi) all'interno di un complesso di razze sviluppatasi negli ultimi 10.000 anni (Auffray *et al.*, 1990) o addirittura negli ultimi 3.000 anni come proposto da Cucchi *et al.* (2005), ha promosso un nuovo tipo di marcatori nucleari, i microsatelliti, come candidati ideali a rilevare variazioni genetiche fra razze di così recente formazione. L'alto tasso di mutazione e l'elevato polimorfismo di questa nuova generazione di marcatori nucleari, rendono i microsatelliti un potente strumento finalizzato alla risoluzione di aspetti ancora irrisolti della speciazione cromosomica nel *Mus musculus domesticus*.

Il presente lavoro, utilizzando loci microsatelliti mappati in diverse posizioni dei cromosomi (pericentromerica e telomerica), ha permesso di stimare il flusso genico fra razze cromosomiche in due aree di contatto ampiamente analizzate negli anni precedenti attraverso una valutazione indiretta del flusso genico.

Inoltre, il ruolo dei riordinamenti cromosomici è stato messo in relazione alla variazione morfologica emersa all'interno del campione esaminato. Fino ad oggi, infatti, ancora non è chiaro se, e in quale entità, la separazione genetica fra le razze cromosomiche ha permesso l'evolversi di un differenziamento a livello morfologico (Corti e Thorpe, 1989).

Di seguito saranno esaminati in dettaglio i risultati ottenuti nelle analisi citogenetiche, genetiche e morfologiche relative alle due aree di contatto e la discussione sarà estesa collocando il caso del *Mus musculus domesticus* all'interno del fenomeno della speciazione cromosomica.

4.1 - Area di ibridazione

4.1.1 - Struttura cromosomica

Le analisi citogenetiche effettuate sugli esemplari catturati nell'area di ibridazione hanno rivelato che la zona in esame non si è modificata in maniera consistente in posizione ed in ampiezza rispetto alle passate osservazioni (Spirito *et al.*, 1980; Castiglia e Capanna (1999a). Le due catture effettuate al limite nord dell'area di ibridazione (località Le Mole 2, popolazione MOL, vedi figura 3.4 e appendice A) hanno presentato animali con cariotipo a 22 cromosomi e gli otto topi catturati oltre il limite nord dei precedenti studi sono risultati anch'essi appartenenti alla razza CD. Gli individui catturati all'interno dell'area di ibridazione hanno mostrato una variazione del numero cromosomico conforme a quello rivelato in passato. Al limite meridionale dell'area di ibridazione sono stati rilevati esemplari con cariotipo standard ed ibridi ad alto numero cromosomico; in particolare, la località Mompeo bassa, contrassegnata dal numero 13 nella carina in figura 3.4, ha presentato quattro individui ibridi ($2n = 35, 36, 38, 39$) che indicano una parziale introgressione di metacentrici nell'area dominata dalla razza standard. Tale introgressione è confermata dalla presenza di un individuo

ibrido ($2n = 39$) nella località Granica (numero 14 in figura 3.4). Le introgressioni osservate possono indicare uno spostamento verso il basso dell'area di ibridazione, ma più probabilmente sono il risultato di una recente introduzione passiva. La presenza di un'unica via di collegamento fra l'area di ibridazione e l'area a cariotipo standard e le caratteristiche rurali dei siti di campionamento (gli animali sono stati catturati in casali agricoli dotati di grandi veicoli adibiti al trasporto del raccolto) fanno pensare all'introduzione passiva di animali con alto numero di metacentrici, la cui ibridazione con individui a cariotipo standard ha prodotto gli ibridi osservati. Infatti, alcuni degli eterozigoti strutturali catturati a Mompeo bassa presentano un numero cromosomico ($2n = 35-36$) non conforme al limite dell'area di ibridazione ($2n = 38-39$).

4.1.2 - Diversità genetica e differenziamento fra le popolazioni

I dati ottenuti hanno evidenziato un alto grado di polimorfismo dei loci microsatelliti in *Mus musculus domesticus*, confermando quanto emerso in altri lavori effettuati sul topo delle case. Anche i livelli di eterozigosi attesa ed osservata rientrano nell'intervallo di valori rilevati in una serie di studi che ha utilizzato gli stessi marcatori (Dallas *et al.*, 1998; Riginos e Nachman, 1999; Panithanarak *et al.*, 2004).

L'analisi dei livelli di eterozigosi nelle 10 popolazioni esaminate ad ogni locus ha mostrato deviazioni significative dall'equilibrio di Hardy-Weinberg in 19 combinazioni locus/popolazione, di cui 14 causate da un deficit di eterozigoti. Una situazione di questo tipo può avere diverse spiegazioni, a seconda della popolazione interessata. In località Madonna del Mattone (MDM), la popolazione che ha presentato il numero più elevato di deviazioni (7 loci su 12 analizzati deviano da H-W) è rappresentata da un alto numero di individui (25) catturati in un unico ristretto sito (una piccionaia). L'alto tasso di inincrocio prodotto da una situazione di questo tipo è un delle cause più probabili del deficit di eterozigoti osservato (in 5 loci su 7). Le altre popolazioni hanno presentato deviazioni da H-W in un numero minore di loci (da 1 a 3). In tal caso, oltre all'inincrocio, un'altra causa del deficit di eterozigoti può essere rappresentata dall'effetto Wahlund, risultato dell'unione di più sottopopolazioni la cui totalità degli individui non si comporta come un'unica unità riproduttiva; in questo lavoro, l'effetto Wahlund può essere messo in relazione all'accorpamento di individui catturati in siti diversi, anche se separati da una ridotta distanza geografica. Non è da escludere, inoltre, la presenza di alleli nulli, più volte descritta nei microsatelliti (Lehmann *et al.*, 1996; Dakin e Avise, 2004).

Per confermare questa ipotesi sarebbe necessario saggiare i loci sospetti (quelli che presentano un deficit di eterozigoti in più popolazioni) nel confronto fra genitori e progenie. Genitori che presentano genotipi omozigoti per un determinato allele, necessariamente devono originare una progenie nella quale l'allele in esame sia presente; in caso contrario si può affermare che il genotipo omozigote del genitore sia in realtà un genotipo eterozigote per un allele nullo (Jerry *et al.*, 2004). Infine, i quattro casi in cui le deviazioni da H-W sono causate da eccesso di eterozigoti possono essere spiegati in base al modello *Isolate breaking*, secondo il quale una popolazione incrementa il suo *pool* genico a causa di eventi di migrazione da altre popolazioni. Il modello descritto può adattarsi all'area in esame, dove le popolazioni non sono soggette ad isolamento geografico ed il flusso genico fra popolazioni contigue, ed anche fra popolazioni lontane tramite il trasporto passivo, è stato evidenziato nelle analisi genetiche effettuate.

L'assenza di *linkage disequilibrium* in tutte le coppie di loci analizzate in ogni popolazione è in accordo con la mappatura dei loci stessi. La verifica del flusso genico dipendente dalla zona del cromosoma, uno degli obiettivi principali del presente lavoro, ha diretto la scelta dei loci microsatelliti in posizioni pericentromerica e telomerica; questi, poi, sono stati selezionati su diverse braccia cromosomiche in modo da ottenere un modello generalizzabile a tutti i cromosomi. La coesistenza delle due condizioni elencate riduce al minimo la possibilità che due loci siano *linked* durante la ricombinazione.

Per quanto riguarda la struttura delle popolazioni, i valori emersi dalla statistica F (Wright, 1951; Weir e Cockerham, 1984), R (Slatkin, 1995) e da misure di distanza genetica (Nei, 1978) indicano un livello di differenziamento genetico abbastanza alto fra le popolazioni analizzate ($F_{ST} = 0.14$; $R_{ST} = 0.24$) se comparato a piccoli mammiferi non commensali in una situazione geografica simile (ad esempio nel *Sorex araneus*, Lugon-Moulin *et al.*, 2000: $F_{ST} = 0.05$; $R_{ST} = 0.11$). I valori sono comparabili, invece, ad un altro lavoro sul *Mus musculus domesticus*, sempre in condizioni ambientali paragonabili (Dallas *et al.*, 1998: $F_{ST} = 0.14-0.34$; $R_{ST} = 0.08-0.31$). I valori più alti dell'intervallo si riferiscono a confronti con popolazioni molto distanti: oltre 60 chilometri).

Inoltre, il *test* di Mantel ha evidenziato assenza di correlazione fra distanza genetica e distanza geografica. Una situazione di questo tipo fa supporre che vi sia scarsa propensione degli individui a migrare fra le popolazioni e che il trasporto passivo svolga un ruolo predominante in un organismo strettamente commensale come il topo delle case. La particolare struttura del transetto, costituito da abitazioni isolate, collegate da un'unica strada che percorre una vallata montana caratterizzata da intensa attività agricola, giustifica gli alti valori di

differenziamento genetico e l'assenza di correlazione fra distanza genetica e geografica osservata.

L'analisi dettagliata dei valori di differenziamento genetico all'interno delle popolazioni appartenenti alla stessa razza cromosomica ($2n = 22$ CD o $2n = 40$) e fra le popolazioni ibride ha evidenziato un differenziamento genetico più elevato fra queste ultime. Questo mostra come l'area di ibridazione funge da barriera al libero scambio di geni fra le razze parentali localizzate alle estremità del transetto. Tale riduzione del flusso genico era stata, prima d'ora, solamente ipotizzata da analisi sulla fertilità degli ibridi (Redi e Capanna, 1988; Hauffe e Searle, 1998; Castiglia e Capanna, 2000). Una componente aggiuntiva a questa riduzione del flusso genico nella zona ibrida può essere supposta dopo un attento esame del transetto di studio. Lungo il suo sviluppo, infatti, non esistono vere e proprie barriere geografiche, ma la parte centrale della zona ibrida è caratterizzata da una rarefazione degli abitati che potrebbe influenzare la migrazione fra popolazioni.

L'analisi gerarchica AMOVA conferma quanto emerso dagli indici di strutturazione genetica, anche se fra le due razze parentali emerge un differenziamento genetico basso e non significativo. L'AMOVA, infatti, rivela che la differenza genetica esistente fra la razza CD e la razza a cariotipo standard è praticamente assente e che la variabilità è espressa in gran parte dal livello intrapopolazionale. Saggiando, però, due diverse ipotesi di struttura (due gruppi: popolazioni appartenenti alla razza CD e popolazioni $2n = 40$; tre gruppi: popolazioni CD, popolazioni $2n = 40$ e popolazioni ibride) emerge come la zona ibrida funge da barriera al flusso genico. Infatti, la variazione dovuta alle popolazioni all'interno dei gruppi aumenta considerevolmente passando dall'analisi dei due a quella dei tre raggruppamenti. La riduzione del flusso genico è, quindi, deducibile dal consistente contributo delle popolazioni ibride alla variazione genetica totale.

Uno degli obiettivi fondamentali di questa tesi riguarda l'analisi del flusso genico dipendente dalla posizione sul cromosoma. È emerso da studi citogenetici che il trivalente di ibridi in condizione di eterozigosi strutturale presenta una soppressione del *crossing-over* in zona pericentromerica (Bidau *et al.*, 2001; Castiglia e Capanna, 2002). L'area di ibridazione, data la sua particolare struttura geografica e il coinvolgimento di una razza a basso numero cromosomico ed una a cariotipo standard, ha fornito un modello ideale per saggiare l'effetto di questo fenomeno sulla genetica della popolazione. In questa area tutte le braccia cromosomiche, ad eccezione dei cromosomi sessuali e dell'autosoma 19, hanno la possibilità di trovarsi, durante la ricombinazione, nella configurazione trivalente.

Tutte le analisi effettuate sui singoli loci e su due insiemi di dati comprendenti rispettivamente i loci telomerici e pericentromerici hanno confermato un comportamento diverso delle due regioni cromosomiche. Infatti, i valori di F_{ST} , R_{ST} e G_{ST} calcolati per ogni locus in tutte le popolazioni hanno mostrato valori più alti per i loci pericentromerici rispetto ai telomerici. L'AMOVA, condotta singolarmente per ogni locus, ha mostrato lo stesso modello evidenziato dagli indici di strutturazione genetica. I rapporti reciproci fra le popolazioni, visualizzati tramite alberi di massima verosimiglianza condotti sulle frequenze alleliche delle popolazioni relative ai loci telomerici e pericentromerici, hanno mostrato un'interessante differenza che riflette il flusso genico differenziale: le popolazioni sono distribuite in modo casuale nell'albero costruito in base alle frequenze alleliche dei loci telomerici, mentre in quello relativo ai loci pericentromerici, le popolazioni appartenenti alla stessa razza sono vicine fra di loro e separate dalle popolazioni ibride.

Altro risultato interessante emerge dal *test* di assegnazione genetica eseguito sui due insiemi di dati. Gli individui, considerando solo i loci pericentromerici, sono stati assegnati con un'alta probabilità alla popolazione di appartenenza, 88.4%, contro il 56.4% di individui correttamente assegnati prendendo in considerazione solamente i loci telomerici. Il risultato del *test* mostra come le popolazioni analizzate con i soli loci telomerici siano geneticamente più omogenee, delle stesse analizzate tramite i loci pericentromerici.

4.2 - Area di contatto

4.2.1 - Struttura cromosomica

Un confronto temporale per quanto riguarda la struttura cromosomica dell'area di contatto non è stato possibile poiché sono stati utilizzati solamente gli animali catturati e caratterizzati citogeneticamente negli anni precedenti (Castiglia *et al.*, 2002). Il contatto parapatrico fra le due razze Cittaducale (CD $2n = 22$) e Ancarano (ACR $2n = 24$) rientra in una casistica alla quale è stata attribuita poca attenzione. Meno studi, infatti, sono stati dedicati al contatto fra razze robertsoniane (ad esempio in Valtellina fra la razza Poschiavo, POS $2n = 26$ e la razza Upper Valtellina, UV $2n = 24$: Capanna e Corti, 1982) in confronto al contatto fra razze a cariotipo standard e razze robertsoniane. La razza ACR e la razza CD si differenziano

per tutti i metacentrici che le compongono, quindi, la complessa situazione degli ibridi di F1 si traduce nella completa sterilità nei maschi (Malorni *et al.*, 1982). L'incompatibilità cromosomica delle due razze e il fatto che sono stati catturati solamente due probabili ibridi fanno supporre una drastica riduzione del flusso genico fra le due razze (Castiglia *et al.*, 2002)

L'analisi dei loci microsatelliti ha permesso di verificare, tramite un marcatore nucleare, lo stato di separazione fra le due razze.

4.2.2 - Diversità genetica e differenziamento fra le popolazioni

Il polimorfismo dei loci microsatelliti si è rivelato abbastanza alto, ma di entità minore rispetto a quello osservato nell'area di ibridazione. Anche i livelli di eterozigosi attesa ed osservata sono più bassi. Non si sospetta nessun meccanismo in grado di produrre questa discrepanza, quindi, considerando il fatto che i valori ottenuti rientrano nell'intervallo osservato in altri lavori sul *Mus musculus domesticus* (Dallas *et al.*, 1998; Riginos e Nachman, 1999; Panithanarak *et al.*, 2004), si può ipotizzare che la variazione mostrata fra le due aree sia da attribuire a fattori casuali.

Le 6 popolazioni analizzate hanno presentato deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg in 2 loci nella popolazione PizACR e in un locus nella popolazione PizCD (le due popolazioni di Pizzoli, area di sovrapposizione dei due cariotipi) manifestando nei tre casi un eccesso di omozigoti. Come discusso per l'area di ibridazione, l'effetto Wahlund sembra sia la spiegazione più probabile delle deviazioni osservate. Le due popolazioni PizCD e PizACR sono state costituite tramite il raggruppamento di più siti di cattura (vedi figura 3.9) la cui totalità degli individui probabilmente non si comporta come una singola entità riproduttiva. Questa spiegazione è supportata dal fatto che le uniche deviazioni da H-W si osservano nelle popolazioni costituite da un numero maggiore di siti di cattura.

Anche nel caso della presente area di contatto, l'assenza di *linkage disequilibrium* fra tutte le possibili coppie di loci in ogni popolazione è in accordo con la mappatura dei loci, gli stessi utilizzati nello studio dell'area di ibridazione.

Dall'analisi della struttura di popolazione sono emersi valori che indicano una struttura genetica abbastanza alta fra le popolazioni (F_{ST} , R_{ST} e D) in esame. I valori riscontrati, calcolati su tutte le popolazioni, sono più alti rispetto a quelli dell'area di ibridazione (ad esempio, $F_{ST} = 0.19$, area contatto, $F_{ST} = 0.14$, area di ibridazione), effetto dovuto principalmente agli alti

valori fra popolazioni appartenenti alle due razze cromosomiche diverse. Osservando le stime degli indici F_{ST} , R_{ST} e D calcolati fra coppie di popolazioni, infatti, emerge come le due popolazioni della razza CD presentano valori di differenziamento bassi e non significativi. La situazione all'interno della razza ACR, dove le popolazioni sono tra loro abbastanza differenziate, può essere paragonata alla situazione osservata nell'area di ibridazione, dove l'isolamento legato allo stile di vita commensale si riflette in un differenziamento notevole, anche in assenza di barriere geografiche. Il maggior differenziamento genetico si riscontra dal confronto tra le popolazioni della razza CD con quelle della razza ACR. Tale risultato è particolarmente significativo considerando l'alto differenziamento nella cittadina di Pizzoli, dove le due razze coesistono in parapatria senza la presenza di un evidente differenziamento geografico.

Il *test* di Mantel, evidenziando assenza di correlazione fra distanza genetica e geografica, conferma quanto rilevato dagli indici di strutturazione. L'esempio più evidente fra assenza di tale correlazione è fornito dalle popolazioni PizCD e PizACR, molto vicine geograficamente ma, appartenendo a due diverse razze cromosomiche, distanti geneticamente. L'AMOVA, ulteriore conferma del modello emerso dagli indici di differenziamento genetico, mostra come l'ipotesi di raggruppamento fra le popolazioni della stessa razza è consistente. La variazione fra gruppi è alta (7.39%) e significativa ($p < 0.05$). A differenza di quanto emerso nell'analisi dell'area di ibridazione, dove i gruppi formati dalle due razze cromosomiche non hanno presentato variazioni consistenti nonostante la distanza interposta fra di loro (circa 20 Km), le due razze CD e ACR sono risultate geneticamente separate nonostante il contatto parapatrico.

Il modello delineato qui sopra trova un ulteriore supporto dall'analisi dell'albero di massima verosimiglianza. In questo albero le popolazioni appartenenti alla stessa razza cromosomica sono separate e le differenze genetiche fra le popolazioni non sono correlate alla distanza geografica (fra la popolazione PizACR e PizCD sono interposte altre popolazioni a 24 cromosomi).

Il *test* di assegnazione, eseguito tramite il programma GENECLASS (Cornuet *et al.*, 1999), e l'ipotesi di struttura, saggiata con il programma STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), forniscono la stessa indicazione: esiste una netta separazione genetica fra le due razze cromosomiche oltre ad un secondo livello di separazione esistente fra le popolazioni. Mentre il primo livello può essere spiegato dal basso flusso genico esistente fra le razze, determinato dalle nette incompatibilità genomiche, il secondo livello può essere legato al commensalismo del topo che limita la migrazione fra popolazioni. I due programmi evidenziano come il

differenziamento genetico fra le due razze cromosomiche sia ben definito assegnando correttamente tutti gli individui alla razza di provenienza. Dalla consistenza del risultato ottenuto, STRUCTURE potrebbe fornire, in futuro, uno strumento utile per assegnare gli esemplari catturati in quest'area ad una delle due razze senza dover ricorrere necessariamente all'analisi citogenetica. Il *software* esegue un'analisi sui genotipi dei singoli individui senza ricevere in *input* l'informazione riguardante la popolazione o la razza di appartenenza, quindi, la sola caratterizzazione genotipica sarebbe sufficiente ad ottenere un'attribuzione cariotipica indiretta.

4.3 - Analisi morfologica

L'analisi morfometrica eseguita sulle due aree di contatto e sull'intero campione a disposizione ha fornito un notevole contributo riguardo allo studio delle differenze all'interno della sottospecie *Mus musculus domesticus*. Inoltre, ha permesso di formulare alcune ipotesi in relazione al ruolo della separazione genetica ed ambientale nella diversità morfologica osservata.

Gli esami conformazionali dell'area di ibridazione hanno evidenziato un leggero differenziamento fra gli individui appartenenti alle due razze cromosomiche (CD $2n = 22$ e standard $2n = 40$), anche se la particolare struttura del transetto di studio non ha permesso di asserire che le variazioni di forma, visualizzate anche tramite griglie di deformazione, siano il risultato dei diversi assetti cariotipici.

Infatti, le popolazioni sono disposte su un transetto longitudinale dove la razza CD occupa l'estremità settentrionale e la razza standard quella meridionale. Le componenti climatiche differenti fra le due estremità del transetto (la zona settentrionale è più soggetta ad un clima montano di tipo appenninico) potrebbero influire sulle variazioni di forma delle due razze. L'analisi PLS (Rohlf e Corti, 2000), evidenziando l'esistenza di una correlazione bassa ma significativa, fra variabili ambientali e morfologiche, conferma quanto emerso dalle analisi statistiche.

Inoltre, la variazione di forma fra popolazioni è risultata altamente significativa e non è evidente un modello di tipo clinale. Una situazione di questo tipo fa pensare che la variazione

fra popolazioni sia il risultato di eventi stocastici, anche se una componente adattativa non può essere totalmente esclusa.

Se le popolazioni a 22 e a 24 cromosomi e le popolazioni ibride fossero disposte in modo più eterogeneo forse sarebbe stato possibile separare la componente ambientale da quella genetica e stabilire se le variazioni di forma siano da attribuire ad una componente stocastica o genetica.

Dalle analisi condotte sulle diverse regioni della mandibola è emerso che la regione muscolare è quella che più evidenzia le differenze conformazionali fra le razze cromosomiche in esame. Questo risultato, supportato dal fatto che questa regione sembra più soggetta ad influenze genetiche rispetto alla regione dentale (Klingenberg e Leamy, 2001; Klingenberg *et al.*, 2001), tende a dare credito all'ipotesi che nelle variazioni di forma delle due razze la componente genetica non sia da escludere. Le leggere differenze di forma fra la razza CD e la razza standard, in questa situazione, potrebbero riflettere il debole differenziamento genetico delle due razze cromosomiche emerso dall'analisi dei loci microsatelliti.

Per quanto riguarda la taglia, le differenze significative emerse fra gli ibridi e la razza standard possono essere spiegate in funzione delle variabili ambientali. Le regressioni effettuate, infatti, mostrano una correlazione positiva fra taglia e longitudine e fra taglia e altitudine. L'aumento delle dimensioni corporee all'aumentare dell'altitudine (e quindi al diminuire della temperatura) è un fenomeno documentato nei mammiferi (Bergman, 1847) e il topo delle case, in questo caso, sembra seguire questa legge. Le popolazioni ibride sono localizzate al centro del transetto, dove la quota è maggiore, a differenza delle popolazioni a cariotipo standard, localizzate nella zona di minore altitudine. Anche la presenza di correlazione con la longitudine può essere spiegata facendo riferimento alla quota. Un attento esame dell'area di ibridazione mostra come le popolazioni più orientali siano anche quelle localizzate a quota minore (GRA e MNT).

L'analisi morfometrica dell'area di contatto ha evidenziato una differenza molto più accentuata nella forma della mandibola fra le due razze cromosomiche CD e ACR. Le differenze emergono fin dall'analisi preliminare dei componenti principali (*relative warp analysis*: Rohlf, 1993), che opera un ordinamento degli individui senza tener conto di alcun tipo di raggruppamento eseguito a priori. L'analisi dei componenti principali condotta sugli individui dell'area di ibridazione non aveva permesso di distinguere i tre gruppi cromosomici, differenze che sono emerse solo dopo l'applicazione di tecniche in grado di operare su raggruppamenti eseguiti a priori.

Le differenze di forma sono evidenti anche tramite griglie di deformazione relative all'asse che esprime la maggior parte della variazione nell'analisi delle componenti principali e sono concentrate sul processo coronoidale, che negli individui della razza ACR presenta un avanzamento rispetto agli esemplari della razza CD e sull'estremità anteriore dell'alveolo incisivo, che si espande in senso dorso-ventrale negli esemplari ACR (dente di maggiore dimensione). Questa caratteristica degli esemplari ACR può essere correlata alla maggior aggressività della razza in questione rispetto alla CD, meccanismo di isolamento precopula descritto nell'area di contatto in esame da Carpitetti e Castiglia (2004). Corti e Rohlf (2001), infatti, in un lavoro sull'evoluzione cromosomica associata a variazioni fenotipiche nel topo delle case, dimostrano come l'aggressività dei topi sia legata ad un cambiamento conformazionale di questo tipo. L'analisi della forma, estesa alle popolazioni, mostra l'esistenza di una variazione significativa fra di esse, confermando quanto emerso nell'analisi dell'area di ibridazione, ma nell'area di contatto la componente di variazione esistente fra le razze è di entità tale da non essere mascherata dall'effetto dovuto alle popolazioni.

L'area di contatto, a differenza dell'area di ibridazione, si trova in condizioni ambientali omogenee, dove le differenze altitudinali e climatiche relative ai siti di cattura non sono differenti. Questa evidenza è stata confermata dall'analisi PLS, che ha mostrato una bassa correlazione fra variazione di forma e variabili ambientali; il gradiente latitudinale che emerge dall'analisi può essere interpretato alla luce della distribuzione delle razze cromosomiche, più settentrionale la razza ACR, più meridionale la CD, e quindi della variabilità morfologica ad esse associata.

La situazione descritta tende ad escludere che le variazioni di forma fra razze e fra popolazioni riflettano un qualche tipo di adattamento a differenti condizioni ambientali e fa supporre che una componente stocastica ed una genetica abbiano giocato un ruolo fondamentale nel modello osservato. Infatti, se da una parte l'assenza di correlazione fra flusso genico e differenze di forma fra popolazioni (mostrata dal *test* di Mantel) e l'omogeneità ambientale osservata mostrino la casualità delle variazioni conformazionali, la netta separazione morfologica fra le due razze cromosomiche sembra riflettere la separazione genetica fra le razze stesse. La drastica riduzione del flusso genico fra la razza CD e la razza ACR, dedotta dalle analisi citogenetiche e confermata dall'analisi dei microsatelliti, ha probabilmente permesso di evolvere caratteri morfologici distintivi nei due gruppi cromosomici.

Per quanto riguarda la taglia, l'analisi non ha mostrato differenze significative fra le razze cromosomiche, fra le popolazioni e fra i sessi e non è emersa, inoltre, alcuna correlazione

con i parametri ambientali esaminati. Questa situazione conferma quanto emerso nello studio della taglia nell'area di ibridazione, dove le uniche differenze osservate sono state spiegate alla luce di un effetto altitudinale. Le differenze di quota fra i siti di cattura sono trascurabili nell'area di contatto. Si può supporre, quindi, che la taglia, a differenza della forma, non sia influenzata da una componente genetica e mostri un elevato tasso di omogeneità. Un fattore che potrebbe indurre differenze significative nelle dimensioni, la differenza altitudinale, è in quest'area assente.

L'analisi morfometrica eseguita sull'intero campione (gli individui delle due aree di contatto più quelli catturati ad Anzio, sul litorale romano) ha permesso, inoltre, di fare delle considerazioni generali riguardo le variazioni morfologiche del topo delle case.

Le differenze di forma fra i gruppi cromosomici in esame risultano significative e, come confermato dalle griglie di deformazione, mostrano come il settore muscolare della mandibola sia maggiormente responsabile delle differenze osservate. L'analisi della variazione di forma a livello popolazionale, però, non evidenzia un modello che consente di affermare l'esistenza di una relazione fra gruppo cromosomico e divergenza conformazionale. La MANOVA ha evidenziato differenze altamente significative fra le popolazioni e l'analisi discriminante ha mostrato come queste differenze siano consistenti fra coppie di popolazioni a prescindere della razza di appartenenza. Le relazioni fra le popolazioni, infatti, sembrano abbastanza casuali, ad eccezione di quelle appartenenti alla razza ACR, che formano un gruppo distinguibile. L'unica popolazione significativamente diversa da tutte le altre è quella di Anzio, la cui differenza conformazionale può avere diverse spiegazioni fra le quali le condizioni ambientali uniche (macchia mediterranea) e la grande distanza rispetto alle due aree di contatto (assenza di flusso genico). Inoltre, il fatto che alcune analisi (*minimum spanning tree* e alberi di massima verosimiglianza) indicano una relazione morfologica fra la popolazione di Anzio e quelle della razza ACR (ambiente montano) fanno supporre che la componente stocastica svolga un ruolo di primo piano nelle differenze osservate. E' da notare come la componente ambientale sia di difficile interpretazione in un organismo strettamente commensale, almeno nelle aree studiate, come il *Mus musculus domesticus*.

L'analisi della taglia ha confermato quanto emerso dalle analisi delle singole aree di contatto. La popolazione di Anzio, infatti, ha presentato gli individui mediamente più piccoli, paragonabili solamente a quelli delle due popolazioni a 40 cromosomi dell'area di ibridazione (popolazioni GRA e MNT). Anche se questo risultato potrebbe far supporre una relazione fra

razza standard e dimensioni (gli individui con cariotipo standard sono più piccoli) l'ipotesi più probabile è quella della relazione fra dimensioni ed altitudine (gli individui localizzati a quota minore sono più piccoli). Le tre popolazioni a 40 cromosomi sono quelle localizzate a quote minori, inoltre, le popolazioni MDM e MMP, costituite per la maggior parte da individui con cariotipo standard presentano un'alta dimensione media degli individui e si trovano ad un'altitudine abbastanza elevata.

L'analisi ha evidenziato anche una differenza, seppure al limite della significatività, fra maschi e femmine, queste ultime di dimensioni maggiori. Non avendo conferma di un tale fenomeno in letteratura, si può supporre che le differenze osservate siano dovute alle ridotte dimensioni del campione.

5 - CONCLUSIONI

I risultati ottenuti permettono di chiarire, in base ad evidenze molecolari, alcuni meccanismi che stanno alla base del processo di speciazione cromosomica del *Mus musculus domesticus* e forniscono una serie di informazioni inerenti le variazioni morfologiche all'interno del complesso sistema delle razze robertsoniane.

Per la prima volta tramite un marcatore molecolare, è stato confermato il ruolo svolto dall'area di ibridazione come barriera al flusso genico, suggerito da Castiglia e Capanna (1999a) in uno studio sulla fertilità degli ibridi.

L'aspetto più importante emerso dallo studio della zona di ibridazione riguarda l'esistenza di un flusso genico differenziale fra diverse zone dei cromosomi in condizione di eterozigosi strutturale semplice. La presenza di un alto numero di chiasmi nei trivalenti, localizzati principalmente sulle porzioni telomeriche delle braccia cromosomiche (evidenziata da studi citogenetici: Bidau *et al.*, 2001; Castiglia e Capanna 2002), ha favorito l'ipotesi di una soppressione della ricombinazione in zona pericentromerica. Il presente lavoro, tramite l'utilizzo di loci mappati in zona pericentromerica e telomerica, ha dimostrato l'esistenza di un flusso genico differenziale, più alto nei loci telomerici. L'importanza di questo risultato, confermato da un recente lavoro su una zona di ibridazione in Italia settentrionale (Panithanarak *et al.*, 2004), mostra come il differenziamento genetico fra le razze cromosomiche si dovuto, oltre che dall'ipofertilità degli ibridi (Redi e Capanna, 1988; Hauffe e Searle, 1998; Castiglia e Capanna, 2000), anche, e in maniera consistente, dalla soppressione della ricombinazione al centromero nei trivalenti di ibridi in condizioni di eterozigosi strutturale.

Un secondo aspetto, emerso dall'analisi dei loci microsatelliti dell'area di ibridazione tra la razza CD e la razza a cariotipo standard, riguarda lo stato di differenziamento genetico fra le popolazioni esaminate e fra le razze stesse. L'alto livello di separazione genetica esistente fra le popolazioni geografiche e l'assenza di correlazione fra divergenza genetica e distanza fanno ipotizzare che lo stile di vita commensale giochi un ruolo determinante nel topo delle case. Anche in assenza di isolamento geografico, situazione che trova riscontro nella zona ibrida, gli eventi di migrazione sono limitati dalla stretta associazione con gli abitati umani e in

parte legati al trasporto passivo, favorito dal carattere agricolo dei villaggi presenti lungo il transetto di studio.

Il quadro descritto dall'area di contatto fra le due razze robertsoniane CD e ACR ha mostrato una situazione molto diversa. L'analisi dei microsattelliti ha rilevato l'esistenza di un differenziamento genetico fra le razze cromosomiche in esame e di un'elevatissima, se non completa, riduzione del flusso genico. La riduzione osservata, in questo caso non è dipendente dalla posizione del locus, ma dipende solamente dalla sterilità degli ibridi dovuta alla alta incompatibilità genomica fra le razze CD e ACR (basso numero cromosomico e nessun metacentrico in comune). Tale risultato è in accordo con un'indagine genetica eseguita tramite marcatori mitocondriali (Castiglia *et al.*, 2002). Il verificarsi di sporadici eventi di ibridazione non è, però, da escludere. Infatti, la cattura di due probabili ibridi (fra cui un individuo portatore di WART) fa supporre l'esistenza di flusso genico fra la razza CD e la razza ACR, anche se drasticamente limitato. Un ulteriore campionamento nella zona di contatto, concentrato fra i siti più vicini relativi alle due razze cromosomiche, potrebbe dare informazioni supplementari riguardo l'entità degli eventi di ibridazione.

Per quanto riguarda la morfologia, l'utilizzo della morfometria geometrica applicata alla mandibola, ha evidenziato come l'interazione di più variabili abbia un ruolo determinante nella distribuzione delle variazioni di forma nel *Mus musculus domesticus*. La recente formazione delle razze robertsoniane, avvenuta negli ultimi 10.000-3.000 anni (Auffray *et al.*, 1990; Cucchi *et al.*, 2005), non sembra aver permesso un netto differenziamento morfologico fra le razze stesse. Infatti, sia l'adattamento a particolari condizioni ambientali che una componente di tipo stocastico potrebbero essere in grado, in alcuni casi, di mascherare le variazioni di forma dovute ad una componente genetica. Dai risultati ottenuti, infatti, è evidente la relazione fra flusso genico e variazioni morfologiche. L'analisi dell'area di ibridazione, a causa della continuità genetica che interessa l'intero transetto di studio, non ha permesso di rilevare un chiaro differenziamento imputabile al diverso assetto cariotipico.

Diversamente, l'area di contatto, dove le due razze cromosomiche hanno mostrato una netta separazione genetica, ha mostrato differenze morfologiche ben definite fra gli individui con assetto cromosomico CD e quelli con cariotipo ACR. L'uniformità ambientale dell'area di contatto, a differenza dell'area ibrida dove le condizioni climatiche e altitudinali variano lungo il transetto, potrebbe aver contribuito a far emergere le differenze morfologiche osservate. L'estensione della scala di analisi, tramite l'inserimento dell'intero campione a disposizione, ha confermato il modello emerso nelle analisi delle singole aree, ovvero l'interazione di una

componente genetica, una ambientale ed una stocastica nella variazione morfologica all'interno del sistema di razze robertsoniane del *Mus musculus domesticus*.

6 - BIBLIOGRAFIA

- Atchley WR, Hall BK. 1991.** A model for development and evolution of complex morphological structures. *Biological Reviews* **66**: 101-157.
- Auffray J-C, Vanlerberghe F, Britton-Davidian J. 1990.** The house mouse progression in Eurasia: a palaeontological and archaeozoological approach. *Biological Journal of the Linnean Society* **41**: 13-25.
- Auffray J-C, Fontanillas P, Catalan J, Britton-Davidian J. 2001.** Developmental stability in house mice heterozygous for single Robertsonian fusion. *Journal of Heredity* **92**: 23-29.
- Bailey DW. 1986.** Genes that affect morphogenesis of the murine mandible: recombinant-inbred strain analysis. *Journal of Heredity* **77**: 17-25.
- Barton NH. 1979.** The dynamics of hybrid zones. *Heredity* **43**: 341-359.
- Barton NH. 1983.** Multilocus clines. *Evolution* **37**: 454-471.
- Barton NH, Hewitt GM. 1985.** Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113-148.
- Barton NH, Slatkin M. 1986.** A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* **56**: 409-415.
- Bauchau V, Smets S, Viroux MC, Nootens D, De Caritat AK. 1990.** Robertsonian translocations in free-living populations of the house mouse in Belgium. *Biological Journal of the Linnean Society* **41**: 193-201.
- Bazykin AD. 1969.** Hypothetical mechanism of speciation. *Evolution* **23**: 685-687.

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 2001.** GENETIX, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bergmann C. 1847.** Über die Verhältnisse der wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Göttinger Studien* **3**: 595-708.
- Bidau CJ, Giménez MD, Palmer CL, Searle JB. 2001.** The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity* **87**: 305-313.
- Bookstein FL. 1989.** Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **11**: 567-585.
- Bookstein FL. 1991.** Morphometric tools for landmark data. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Britton-Davidian J, Catalan J, Ramalhinho MG, Ganem G, Auffray J-C, Capela R, Biscoito M, Searle JB, Mathias ML. 2000.** Rapid chromosomal evolution in island mice. *Nature* **403**: 158.
- Britton-Davidian J, Catalan J, Belkhir K. 2002.** Chromosomal and allozyme analysis of a hybrid zone between parapatric Robertsonian races of the house mouse: a case of monobrachial homology. *Cytogenetic and Genome Research* **96**: 75-84.
- Capanna E, Cristaldi M, Perticone P, Rizzoni M. 1975.** Identification of chromosomes involved in the 9 Robertsonian fusions of the Apennine mouse with a 22-chromosome karyotype. *Experientia* **31**: 294-296.
- Capanna E, Gropp A, Winking H, Noack G, Civitelli M-V. 1976.** Robertsonian metacentrics in the mouse. *Cromosoma* **58**: 341-353.

- Capanna E, Civitelli MV, Cristaldi M, Noack G. 1977.** New Robertsonian metacentrics in another 22-chromosome mouse population in central Apennines. *Experientia* **33**: 173-175.
- Capanna E. 1982.** Robertsonian numerical variation in animal speciation: *Mus musculus*, an emblematic model. In: Barigozzi C, (Ed). Mechanism of speciation. Alan Liss, New York, pp 155-177.
- Capanna E, Corti M. 1982.** Reproductive isolation between two chromosomal races of *Mus musculus* in the Rhaetian Alps (northern Italy). *Mammalia* **46**: 107-109.
- Capanna E, Corti M, Nascetti G. 1985.** Role of the contact areas in the chromosomal speciation of the European long-tailed house mouse (*Mus musculus domesticus*). *Bollettino di Zoologia* **52**: 97-119.
- Capanna E, Redi CA. 1994.** Chromosomes and microevolutionary processes. *Bollettino di Zoologia* **61**: 285-294.
- Capanna E, Redi CA. 1995.** Whole-arm reciprocal translocation (WART) between Robertsonian chromosomes: finding of a Robertsonian heterozygous mouse with karyotype derived through WARTs. *Chromosome Research* **3**: 135-137.
- Capanna E, Castiglia R. 2004.** Chromosomes and speciation in *Mus musculus domesticus*. *Cytogenetic and Genome Research* **105**: 375-384.
- Carpinetti M, Castiglia R. 2004.** Analysis of behavioural discrimination mechanisms in a contact zone between two metacentric races of the house mouse, *Mus musculus domesticus*, in central Italy. *Accademia nazionale dei Lincei rendiconti* **15**: 31-41.
- Castiglia R, Capanna E. 1999a.** Contact zones between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 1. Temporal analysis of hybrid zone between the CD chromosomal race (2n=22) and populations with the standard karyotype. *Heredity* **83**: 319-326.

- Castiglia R, Capanna E. 1999b.** Whole-arm reciprocal translocation (WART) in a feral population of mice. *Chromosome Research* **7**: 493-495.
- Castiglia R, Capanna E. 2000.** Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 2. Fertility and segregation in laboratory-reared and wild mice heterozygous for multiple Robertsonian rearrangements. *Heredity* **85**: 147-156.
- Castiglia R, Capanna E. 2002.** Chiasma repatterning across a chromosomal hybrid zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. *Genetica* **114**: 35-40
- Castiglia R, Annesi F, Capanna E. 2002.** Contact zones between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 3. Molecular and chromosomal evidence of restricted gene flow between the CD race (2n 5 22) and the ACR race (2n 5 24). *Heredity* **89**: 219-224.
- Castiglia R, Caporioni M. 2005.** Altitudinal distribution and outdoor occurrence in chromosomal races of the house mouse (*Mus musculus domesticus*) in central Italy. *Folia Zoologica* **54**: 225-239.
- Catalan J, Britton-Davidian J. 1998.** Spontaneous occurrence of a new centric fusion and a fission through non-reciprocal single arm translocation (SAT) in a Robertsonian house mice. Abstract Euro-American Mammal Congress, Santiago de Compostela, Spain, Juli 19-24.
- Catalan J, Auffray J-C, Pellestor F, Britton-Davidian J. 2000.** Spontaneous occurrence of a Robertsonian fusion involving chromosome 19 by single whole-arm reciprocal translocation (WART) in wild-derived house mice. *Chromosome Research* **8**: 593-601.
- Chakrabarti S, Chakrabarti A. 1977.** Spontaneous Robertsonian fusion leading to karyotype variation in the house mouse - first report from Asia. *Experientia* **33**: 175-177.
- Corti M, Parmigiani S, Mainardi D, Capanna E, Brain PF. 1989.** The role of intermale aggression in speciation processes in chromosomal races of house mice. In: Brain, P. F., Mainardi, D., Parmigiani, S., (Ed). *House Mouse Aggression*. Harwood Academic Publishers, London: 49-67.

- Corti M, Thorpe R S. 1989.** Morphological clines across a karyotypic zone of house mice in Central Italy. *Journal of Evolutionary Biology* **2**: 253-264.
- Corti M, Ciabatti CM. 1990.** The structure of a chromosomal hybrid zone of house mice (*Mus domesticus*) in central Italy: cytogenetic analysis. *Journal of zoological systematics and evolutionary research* **28**: 277-288.
- Corti M, Ciabatti CM, Capanna E. 1990.** Parapatric hybridisation in the chromosomal speciation of the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society* **41**: 203-214.
- Corti M, Rohlf FJ. 2001.** Chromosomal speciation and phenotypic evolution in the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society* **73**: 99-112.
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M. 1999.** New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**: 1989-2000.
- Coyne JA, Meyers W, Crittenden AP, Sniegowski P. 1993.** The fertility effects of pericentric inversions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**: 487-496.
- Coyne JA, Orr HA. 1998.** The evolutionary genetics of speciation *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **353**: 287-305.
- Cucchi T, Vigne JD, Auffray J-C. 2005.** First occurrence of the house mouse (*Mus musculus domesticus* Schwarz & Schwarz, 1943) in the Western Mediterranean: a zooarchaeological revision of sub-fossil house mouse occurrences. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 429-445.
- Dakin EE, Avise JC. 2004.** Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**: 504-509.
- Dallas JF. 1992.** Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome* **5**: 32-38.

- Dallas JF, Bonhomme F, Boursot P, Britton-Davidian J, V. Bauchau. 1998.** Population genetic structure in a Robertsonian race of house mice: evidence from microsatellite polymorphism. *Heredity* **80**:70-77.
- Davisson MT. 1996.** Rules and guidelines for gene nomenclature. Pp. 1-16 in M. F. Lyon, S. Rastan, and S. D. M. Brown, (Ed). Genetic variants and strains of the laboratory mouse. 3rd ed., Vol. 1. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
- Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA et al. 1996.** A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**: 149-152.
- Dover GA, Trick M, Strachan T, Coen ES, Brown SDM. 1984.** DNA family turnover and the coevolution of chromosomes. *Chromosomes Today* **8**: 229-240.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- Fatio V. 1869 -** Faune des vertebrates de la Suisse, Vol. 1, Mammiferes. H. Georg., Geneva.
- Felsenstein J. 1989.** PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.
- Futuyma DJ, Mayer GC. 1980.** Nonallopatric speciation in animals. *Systematic Zoology* **19**: 254-271.
- Gaggiotti OE, Lange O, Rassmann K, Gliddon C. 1999.** A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* **8**: 1513-1520.

- Garagna S, Broccoli D, Redi CA, Searle JB, Cook HJ, Capanna E. 1995.** Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma* **103**: 685-692.
- Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E, Redi CA. 2001.** Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 171-175.
- Garagna S, Zuccotti M, Capanna E, Redi CA. 2002.** High-resolution organization of mouse telomeric and pericentromeric DNA. *Cytogenetic and Genome Research* **96**: 125-129.
- Gazave E, Catalan J, Ramalhinho MG, Mathias ML, Nunes AC, Dumas D, Britton-Davidian J, Auffray J-C. 2003.** Fusion in the house mouse. *Genetical Research* **81**: 33-42.
- Goodall CR. 1991.** Procrustes methods in the statistical analysis of shape (with discussion and rejoinder). *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* **53**: 285-339.
- Goodman SJ. 1997.** RST CALC: A collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. *Molecular Ecology* **6**: 881-885.
- Goudet J, Raymond M, De Meeüs T, Rousset F. 1996.** Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**: 1933-1940.
- Goudet J. 2001.** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Institut d'Ecologie, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, Switzerland.
- Gropp A, Tettenborn U, Von Lehmann E. 1969.** Chromosomenvariation von Robertson'schen typus bei der tabakmaus, *Mus poschiavinus*, und ihren hybridisierungen mit der laboratorienmaus. *Cytogenetics* **9**: 9-23.

- Gropp A, Noack G, Kolbus U, Winking H. 1977.** Robertsonian fusion metacentrics. *Mouse News Letter* **57**: 26-28.
- Guo SW, Thompson EA. 1992.** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* **48**: 361-372.
- Hauffe HC, Piálek J. 1997.** Evolution of the chromosomal races of *Mus musculus domesticus* in the Rhaetian Alps: the roles of whole-arm reciprocal translocation and zonal raiation. *Biological Journal of the Linnean Society* **62**: 255–278.
- Hauffe HC, Searle JB. 1998.** Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from Northern Italy. *Genetics* **150**: 1143-1154.
- Hauffe HC, Panithanarak T, Dallas JF, Piálek J, Gündüz I, Searle JB. 2004.** The tobacco mouse and its relatives: a ‘tail’ of coat colours, chromosomes, hybridisation and speciation. *Cytogenetic and Genome Research* **105**: 395-405.
- Hsu TC, Patton JI. 1969.** Bone marrow preparations for chromosome studies, In: Bemirschke K (Ed). Comparative mammalian cytogenetics, *Springer Verlag, Berlin*. Heikdelberg New York, 454-460.
- Jerry DR, Preston N, Crocos PJ, Keys S, Meadows JRS, Li Y. 2004.** Parentage determination of Kuruma prawn shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers. *Aquaculture* **235**: 237-247.
- Kendall DG. 1984.** Shape-manifolds, Procrustean metrics and complex projective spaces. *Bulletin of the London Mathematical Society* **16**: 81-121.
- King M. 1993.** Species Evolution, the role of chromosome change. Cambridge University Press, Cambridge.
- Klingenberg CP, Leamy LJ. 2001.** Quantitative genetics of geometric shape in the mouse mandible. *Evolution* **55**: 2342-2352.

- Klingenberg CP, Leamy LJ, Routman EJ, Cheverud JM. 2001.** Genetic architecture of mandible shape in mice: effects of quantitative trait loci analyzed by geometric morphometrics. *Genetics* **157**: 785-802.
- Lande R. 1985.** The fixation of chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and colonization. *Heredity* **54**: 323-332.
- Leamy LJ. 1993.** Morphological integration of fluctuating asymmetry in the mouse mandible. *Genetica* **89**: 139-153.
- Lehmann T, Hawley WA, Collins FH. 1996.** An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics* **144**: 155-163.
- Lugon-Moulin N, Balloux F, Hausser J. 2000.** Genetic differentiation of common shrew *Sorex araneus* populations among different alpine valleys revealed by microsatellites. *Acta Theriologica* **45**: 103-117.
- Malorni W, Capanna E, Cristaldi M, De Martino E. 1982.** Changes of seminiferous epithelium in hybrids of mice carrying Robertsonian karyotype. *Archives of Andrology* **9**: 333-341.
- Mantel N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- Marcus LF, Hingst-Zaher E, Zaher H. 2000.** Application of landmark morphometric data to skull representing the orders of living mammals. *Hystrix* (n.s) **1**: 27-47.
- Mayr E. 1970.** Populations, Species, and Evolution. Harvard University Press, Cambridge.
- Moore WS. 1977.** An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review of Biology* **52**: 263-277.

- Moriwaki K, Yonekawa H, Gotoh O, Minezawa M, Winking H, Gropp A. 1984.** Implications of genetic divergence between European wild mice with Robertsonian translocations from the viewpoint of mitochondrial DNA. *Genetical Research* **43**: 277-287.
- Muñoz-Muñoz F, Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ, Ventura J. 2003.** Non-metric morphological divergence in the western house mouse, *Mus musculus domesticus*, from the Barcelona chromosomal hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**: 313-322.
- Nachman MW, Boyer SN, Searle JB, Aquadro CF. 1994.** Mitochondrial DNA variation and the evolution of Robertsonian chromosomal races of house mice, *Mus domesticus*. *Genetics* **136**: 1105-1120.
- Nachman MW, Searle JB. 1995.** Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 397-402.
- Nei M. 1973.** Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**: 3321-3323.
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- Nei M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Panithanarak T, Hauffe HC, Dallas JF, Glover A, Ward RG, Searle JB. 2004.** Linkage-dependent gene flow in a house mouse chromosomal hybrid zone. *Evolution* **58**: 184-192.
- Pardo-Manuel de Villena F, Sapienza C. 2001.** Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females. *Mammalian Genome* **12**: 331-339.
- Parks SDE. 2001.** MStools v.3 (Excel Spreadsheet Toolkit for Data Conversion). Smurfit Institute of Genetics, Trinity College, Dublin, Ireland.

- Piálek J, Barton NH. 1997.** The Spread of an Advantageous Allele Across a Barrier: The Effects of Random Drift and Selection Against Heterozygotes. *Genetics* **145**: 493-504.
- Piálek J, Hauffe HC, Rodríguez-Clark KM, Searle JB. 2001.** Racialization and speciation in house mice from the Alps: the role of chromosomes. *Molecular Ecology* **10**: 613-625.
- Piálek J, Hauffe H C, Searle JB, 2005.** Chromosomal variation in the house mouse. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 535-563.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Raymond M, Rousset F. 1995.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248-249.
- Redi CA, Capanna E. 1988.** Robertsonian heterozygotes in the house mouse and the fate of their germ cells. In: Daniel A, (Ed) The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements. New York: Liss, 315-359.
- Redi CA, Garagna S, Della Valle G, Bottilroli G, Dell'Orto P, Viale G, Peverali FA, Raimondi E, Forejt J. 1990.** Differences in the organization and chromosomal allocation of satellite DNA between the European long tailed house mice *Mus domesticus* and *Mus musculus*. *Cromosoma* **99**: 11-17.
- Riginos C, Nachman MW. 1999.** The origin of a Robertsonian chromosomal translocation in house mice inferred from linked microsatellite markers. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1763-1773.
- Robertson WRB. 1916.** Chromosome studies I. Taxonomic relationship shown in the chromosomes of Tettigoniidae and Acrididae. V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae and Gryllidae: chromosomes and variation. *Journal of Morphology* **27**: 179-331.

- Rohlf FJ, Bookstein F. 1990.** Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop. Special Publication Number 2, The University of Michigan. Museum of Zoology: Ann Arbor.
- Rohlf FJ, Slice D. 1990.** Extension of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* **39**: 40-59.
- Rohlf FJ. 1993.** Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. in: *Contributions to morphometrics* (Marcus LF, Bello E, Garcia-Valdecasas A, (Ed) pp 131-190. *Monografias del Museo Nacional de Ciencias Naturales*, Vol. 8 Madrid, Spain.
- Rohlf FJ, Marcus LF. 1993.** A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* **8**: 129-132.
- Rohlf FJ. 2000.** On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix* (n.s) **11**: 9-25.
- Rohlf FJ, Corti M. 2000.** Use of Two-Block partial least-squares to study covariation in shape. *Systematic Biology* **4**: 740-753.
- Rohlf FJ. 2005a.** TpsPls 1.14. Department of Ecology and Evolution, State University of NY, Stony Brook, NY.
- Rohlf FJ. 2005b.** TpsRelw 1.42. Department of Ecology and Evolution, State University of NY, Stony Brook, NY.
- Rohlf FJ. 2006a.** TpsDig 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of NY, Stony Brook, NY.
- Rohlf FJ. 2006b.** NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.2f. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.

- Rousset F. 1997.** Genetic differentiation and estimation of gene flow from F -statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**: 1219-1228.
- Sadoyan T, Castiglia R, Capanna E, Serva L. 2003.** Robertsonian polymorphism in house mouse *Mus musculus domesticus* from an area of intense seismic activity. *Acta Theriologica* **48**: 189-195.
- Sage RD, Atchley WR, Capanna E. 1993.** House mice as models in systematic biology. *Systematic Biology* **42**: 523-561.
- Schemske DW. 2000.** Understanding the origin of species. *Evolution* **54**: 1069-1073.
- Schlotterer C. 2000.** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**: 365-371.
- Schluter D. 1998.** Ecological causes of speciation. In: Howard, D. J. and Berlocher, S. H. (ed). *Endless Forms. Species and Speciation*, 114-129, Oxford University Press, Oxford.
- Schneider S, Kueffer JM, Roessli D, and Excoffier L. 1997.** Arlequin, version 1.1: a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Seabright MA. 1971.** A rapid banding technique for human chromosome. *Lancet* **2**: 71-972.
- Searle JB. 1993.** Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. In: Harrison RG, (Ed) *Hybrid zones and the evolutionary process*. New York: Oxford University Press, 309-353.
- Sites JW, Moritz C. 1987.** Chromosomal evolution and speciation revisited. *Systematic Zoology* **36**: 153-174.
- Slatkin M. 1995.** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**: 457-462.

- Spirito F, Modesti A, Perticone P, Cristaldi M, Federici R, Rizzone M. 1980.** Mechanisms of fixation and accumulation of centric fusions in natural populations of *Mus musculus* L. I. Karyological analysis of a hybrid zone between two populations in the central Apennines. *Evolution* **34**: 453-466.
- Thompson DW. 1917.** On growth and form. Cambridge University Press, London.
- Turelli M, Barton NH, Coyne JA. 2001.** Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 330-343.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38 (6)**: 1358-1370.
- White MJD. 1968.** Modes of Animal speciation. *Science* **159**: 1063-1065.
- White MJD. 1978.** Modes of Speciation, W.H. Freeman & Co.
- Wright S. 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eu-genics* **15**: 313-354.
- Wright S. 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**: 395-420.
- Zima J, Macholán M. 1989.** Robertsonian fusion 5.12 in a population of *Mus musculus musculus*. *Folia Zoologica* **38**: 233-238.

APPENDICE A

Tabella 1 - Area di ibridazione. Esemplari utilizzati nelle analisi genetiche.

Table 1 - Hybridization area. Individuals utilized in the genetic analyses.

Specie	Codice	Sesso	2n	Località	Popolazione
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 10	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 11	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 12	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 13	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 14	M	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 15	M	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 16	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 17	M	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 1	F	23	2 - Le Mole	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 40	M	22	2 - Le Mole	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 68	M	22	2 - Le Mole	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 31	M	22	2 - Le Mole	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 46	F	22	2 - Le Mole	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 14	M	22	3 - Le Mole-A	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 15	M	22	3 - Le Mole-A	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 17	F	22	3 - Le Mole-A	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 30	M	22	3 - Le Mole-A	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 44	F	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 47	M	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 55	F	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 56	F	21	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 65	F	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 66	M	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 78	F	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 12	M	25	5 - Monte Cavallo	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 20	F	24	5 - Monte Cavallo	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 27	M	24	5 - Monte Cavallo	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 36	M	26	5 - Monte Cavallo	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 70	M	27	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 71	F	26	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 84	M	28	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 85	M	27	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 86	F	25	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 87	F	26	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB104	F	25	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 8	F	36	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 38	F	31	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 60	M	35	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 61	M	33	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 62	M	35	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 63	F	33	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB 18	M	34	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB 29	M	37	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB 35	M	34	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB 72	M	34	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB105	F	37	8 - San Benedetto	SBE

<i>M. m. domesticus</i>	SB106	F	33	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB107	F	33	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB108	F	37	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB109	F	36	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB110	F	36	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB111	M	36	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB112	M	33	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB 7	F	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 8	M	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 9	F	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 11	M	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 13	M	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 16	F	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 19	M	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 23	F	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 24	F	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 25	F	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 26	M	38	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 31	F	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 32	M	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 33	M	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 34	M	38	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 37	F	36	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 45	M	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 48	F	37	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 10	M	38	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 21	F	36	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 22	M	38	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 28	F	37	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 38	F	38	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 39	M	38	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 2	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 3	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 4	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 5	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 6	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 41	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 42	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 46	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 50	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 51	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 52	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 53	M	39	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 54	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 59	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 60	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 61	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 62	F	39	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 63	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 64	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 77	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 79	F	39	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 80	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 81	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM

<i>M. m. domesticus</i>	SBP 91	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 92	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 50	F	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 52	F	38	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 53	F	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 54	F	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 55	M	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 56	F	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 58	M	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 59	F	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 40	F	40	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 41	M	40	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 47	F	37	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 48	F	35	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 49	F	40	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 51	M	40	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 57	F	39	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 1	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 4	F	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 5	F	39	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 6	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 7	F	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 24	F	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 25	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 27	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 28	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 44	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 45	F	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 2	M	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 3	F	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 9	F	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 23	M	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 39	M	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 18	M	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 20	F	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 26	F	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 43	M	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 19	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 29	M	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 30	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 32	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 33	M	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 34	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 35	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 36	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 37	M	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 42	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT

Tabella 2 - Area di contatto. Esempolari utilizzati nelle analisi genetiche.**Table 2** - Contact area. Individuals utilized in the genetic analyses.

Specie	Codice	Sesso	2n	Località	Popolazione
<i>M. m. domesticus</i>	AT 40	M	24	3 - Mopolino	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	LAG 3	F	24	3 - Mopolino	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 42	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 43	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 44	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 45	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 50	M	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	LAG 1	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	LAG 2	M	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 21	F	24	5 - Marana	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 22	F	24	5 - Marana	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 34	M	24	5 - Marana	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 35	M	24	5 - Marana	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 9	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 12	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 13	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 14	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 15	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 16	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 17	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 33	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 46	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 47	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 48	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 49	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 51	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 52	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 53	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 54	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 57	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 58	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 59	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 60	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 23	F	24	7 - Barete	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 32	M	24	7 - Barete	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 70	M	24	7 - Barete	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 83	M	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 84	M	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 85	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 93	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 94	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 95	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 96	M	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 97	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 69	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 71	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 79	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 80	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 81	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 82	F	24	9 - Pizzoli 9	PizACR

<i>M. m. domesticus</i>	AT 89	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 90	F	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 91	F	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 92	F	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 25	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 28	M	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 29	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 30	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 61	M	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 62	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 65	M	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 66	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 72	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 31	F	24	11 - Pizzoli 11	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 36	M	24	11 - Pizzoli 11	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 56	F	24	11 - Pizzoli 11	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 64	F	24	11 - Pizzoli 11	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 67	F	22	12 - Pizzoli 12	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 68	F	22	12 - Pizzoli 12	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 75	F	22	13 - Pizzoli 13	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 77	M	22	13 - Pizzoli 13	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 87	F	22	13 - Pizzoli 13	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 73	M	22	14 - Pizzoli 14	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 74	M	22	14 - Pizzoli 14	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 78	F	22	14 - Pizzoli 14	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 88	M	22	14 - Pizzoli 14	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 27	F	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 37	M	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 38	F	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 41	M	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 55	M	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 63	F	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 11	M	22	16 - San Lorenzo	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 19	M	22	16 - San Lorenzo	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 20	M	22	16 - San Lorenzo	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 10	F	22	17 - San Vittorino	SVT
<i>M. m. domesticus</i>	AT 18	F	22	17 - San Vittorino	SVT
<i>M. m. domesticus</i>	AT 39	F	22	17 - San Vittorino	SVT

APPENDICE B

Tabella 1 - Area di ibridazione. Esemplari utilizzati nelle analisi morfologiche.**Table 1** - Hybridization area. Individuals utilized in the morphologic analyses.

Specie	Codice	Sesso	2n	Località	Popolazione
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 10	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 11	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 12	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 13	F	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 14	M	22	1 - Collebaccaro	CBA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 31	M	22	2 - Le Mole	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 46	F	22	2 - Le Mole	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 43	M	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 44	F	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 47	M	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 55	F	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 56	F	21	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 65	F	22	4 - Le Mole-B	MOL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 20	F	24	5 - Monte Cavallo	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 27	M	24	5 - Monte Cavallo	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 36	M	26	5 - Monte Cavallo	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 70	M	27	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 71	F	26	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 74	M	27	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 84	M	28	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 85	M	27	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 86	F	25	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB 87	F	26	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SB104	F	25	6 - San Pietro	SPT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 8	F	36	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 38	F	31	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 60	M	35	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 61	M	33	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 62	M	35	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 63	F	33	7 - Colle del Gallo	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB 18	M	34	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB 29	M	37	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB105	F	37	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB106	F	33	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB107	F	33	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB108	F	37	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB109	F	36	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB110	F	36	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB111	M	36	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB112	M	33	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB114	M	35	8 - San Benedetto	SBE
<i>M. m. domesticus</i>	SB 11	M	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 23	F	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 24	F	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 25	F	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 26	M	38	9 - Colle Paradiso	CPA

<i>M. m. domesticus</i>	SB 31	F	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 32	M	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 33	M	39	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 34	M	38	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 37	F	36	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 45	M	40	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 48	F	37	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 49	M	37	9 - Colle Paradiso	CPA
<i>M. m. domesticus</i>	SB 10	M	38	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 21	F	36	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 22	M	38	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 28	F	37	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 38	F	38	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 39	M	38	10 - Salisano	SAL
<i>M. m. domesticus</i>	SB 6	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 41	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 42	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 46	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 50	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 52	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 53	M	39	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 54	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 59	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 60	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 61	M	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 62	F	39	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 75	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 79	F	39	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 80	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 81	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 89	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SB 93	F	40	11 - Madonna del Mattone	MDM
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 52	F	38	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 53	F	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 55	M	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 56	F	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 58	M	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 59	F	40	12 - Mompeo	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 47	F	37	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 48	F	35	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 51	M	40	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 57	F	40	13 - Mompeo basso	MMP
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 1	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 4	F	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 5	F	39	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 7	F	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 24	F	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 25	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 27	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 28	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 44	M	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 45	F	40	14 - Granica	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 2	M	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 3	F	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA

<i>M. m. domesticus</i>	SBP 9	F	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 23	M	40	15 - Granica (Agriturismo)	GRA
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 18	M	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 20	F	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 21	M	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 22	F	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 26	F	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 43	M	40	16 - Montopoli Sabino A	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 19	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 30	M	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 32	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 33	M	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 34	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 35	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 36	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 37	M	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT
<i>M. m. domesticus</i>	SBP 42	F	40	17 - Montopoli Sabino B	MNT

Tabella 2 - Area di contatto. Esemplari utilizzati nelle analisi morfologiche.

Table 2 - Contact area. Individuals utilized in the morphologic analyses.

Specie	Codice	Sesso	2n	Località	Popolazione
<i>M. m. domesticus</i>	AT 40	M	24	3 - Mopolino	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	LAG 3	F	24	3 - Mopolino	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 42	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 43	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 44	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 45	F	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	AT 50	M	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	LAG 2	M	24	4 - Capitignano	CAP
<i>M. m. domesticus</i>	LAG 4	M	24	1 - San Paganico	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	LAG 5	M	24	2 - Piedicolle	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 22	F	24	5 - Marana	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 34	M	24	5 - Marana	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 35	M	24	5 - Marana	MAR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 9	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 12	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 13	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 14	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 15	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 16	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 17	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 33	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 46	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 47	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 48	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 49	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 51	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 52	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 53	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 58	M	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 59	F	24	6 - Cascina	CAS

<i>M. m. domesticus</i>	AT 60	F	24	6 - Cascina	CAS
<i>M. m. domesticus</i>	AT 23	F	24	7 - Barete	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 24	M	24	7 - Barete	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 70	M	24	7 - Barete	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 83	M	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 84	M	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 85	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 93	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 94	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 96	M	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 97	F	24	8 - Pizzoli 8	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 69	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 71	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 79	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 80	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 81	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 82	F	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 89	M	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 90	F	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 91	F	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 92	F	24	9 - Pizzoli 9	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 25	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 29	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 30	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 61	M	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 62	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 65	M	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 66	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 72	F	24	10 - Pizzoli 10	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 36	M	24	11 - Pizzoli 11	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 56	F	24	11 - Pizzoli 11	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 64	F	24	11 - Pizzoli 11	PizACR
<i>M. m. domesticus</i>	AT 67	F	22	12 - Pizzoli 12	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 68	F	22	12 - Pizzoli 12	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 86	F	24	12 - Pizzoli 12	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 75	F	22	13 - Pizzoli 13	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 87	F	22	13 - Pizzoli 13	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 73	M	22	14 - Pizzoli 14	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 74	M	22	14 - Pizzoli 14	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 88	M	22	14 - Pizzoli 14	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 27	F	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 37	M	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 38	F	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 55	M	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 63	F	22	15 - Villa S.Pietro	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 11	M	22	16 - San Lorenzo	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 19	M	22	16 - San Lorenzo	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 20	M	22	16 - San Lorenzo	PizCD
<i>M. m. domesticus</i>	AT 10	F	22	17 - San Vittorino	SVT
<i>M. m. domesticus</i>	AT 18	F	22	17 - San Vittorino	SVT
<i>M. m. domesticus</i>	AT 39	F	22	17 - San Vittorino	SVT

Tabella 3 - Esempari della popolazione lontana dalle aree di contatto utilizzati nelle analisi morfologiche.*Table 3* - Individuals of the population far from the contact areas utilized in the morphologic analyses.

Specie	Codice	Sesso	2n	Località	Popolazione
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ 1	M	40	Anzio	ANZ
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ 2	F	40	Anzio	ANZ
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ 4	M	40	Anzio	ANZ
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ 6	F	40	Anzio	ANZ
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ13	M	40	Anzio	ANZ
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ14	F	40	Anzio	ANZ
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ15	M	40	Anzio	ANZ
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ17	F	40	Anzio	ANZ
<i>M. m. domesticus</i>	ANZ18	M	40	Anzio	ANZ

RINGRAZIAMENTI

Sono numerose le persone che mi hanno aiutato e sostenuto in questi tre anni e che ho l'obbligo e soprattutto il piacere di ringraziare.

Prima di tutto ringrazio il Prof. Ernesto Capanna, docente guida del mio progetto ed inesauribile fonte di informazioni.

Ringrazio poi il Dott. Erik Verheyen che mi ha ospitato nei laboratori del "Royal Belgian Institute of Natural Sciences", dove ho ricevuto un fondamentale supporto scientifico soprattutto nella persona di Dries Knapen, impareggiabile tutor che mi ha introdotto nell'allora "oscuro" mondo dei microsatteliti.

Un caloroso grazie a tutti i miei colleghi/amici del laboratorio, senza i quali non avrei raggiunto questo traguardo, sia per i preziosi suggerimenti in ambito scientifico sia per il clima familiare che hanno contribuito a creare in un luogo dove ho trascorso periodi davvero piacevoli. Grazie quindi ai miei confinanti di scrivania Paolo ed Emanuela, compagni di studio e di meno impegnati momenti di svago, a Riccardo, prodigo di consigli e suggerimenti durante l'intero svolgimento del mio lavoro ed a Flavia, sempre pronta ad offrire incoraggiamento ed affettuosi consigli. Insieme a loro ringrazio i miei colleghi dottorandi, in particolar modo Valentina, Germana, Maria Vittoria ed Alessandro.

Grazie ai referenti della mia tesi, il Dott. Ettore Randi, la Proff.sa Luciana Sola ed il Prof. Giovanni Destro Bisol, che mi hanno dato preziosi consigli per la stesura finale.

Un ringraziamento speciale alla mia famiglia, che non mi ha mai fatto mancare nulla, mi ha dato un sostegno costante e mi ha sopportato anche durante il "durissimo" periodo della stesura della tesi, costellato da preoccupanti sbalzi di umore.

Grazie a Giulio e a Maio, amici di una vita, che non mi hanno aiutato a campionare, né a scrivere, né ad elaborare i dati, né a stampare la tesi, ma hanno contribuito a formare le persone che sono.

Un ringraziamento a parte lo merita Cristina, per aver cercato di migliorare il mio linguaggio, per avermi sostenuto nei momenti difficili, per avermi stimolato nei periodi di apatia, ma soprattutto per avermi regalato un'infinità di momenti felici ed indimenticabili.

Per finire, un ringraziamento particolare alla persona che cinque anni fa mi ha coinvolto nel mondo della ricerca con la sua grande competenza scientifica e i suoi modi gentili, insostituibile guida e collante del nostro gruppo di ricerca. Un sentito grazie a Marco, principale sostenitore di questo lavoro, che purtroppo ci ha prematuramente lasciato.